



FACULTAD DE MEDICINA

**TRATAMIENTO ALOGÉNICO CON CÉLULAS  
TRONCALES MESENQUIMALES SOBRE LA  
ISQUEMIA CRÍTICA EN UN MODELO MURINO  
DIABÉTICO**

TESIS DOCTORAL

**JESÚS ÁLVAREZ GARCÍA**

**MADRID, 2017**



FACULTAD DE MEDICINA

# **TRATAMIENTO ALOGÉNICO CON CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES SOBRE LA ISQUEMIA CRÍTICA EN UN MODELO MURINO DIABÉTICO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

**JESÚS ÁLVAREZ GARCÍA**

DIRIGIDA POR:

**D. LUIS RIERA DEL MORAL**

**D<sup>a</sup>. SOLEDAD GARCÍA GÓMEZ DE LAS HERAS**

**MADRID, 2017**

Don LUIS FELIPE RIERA DEL MORAL, Profesor asociado del Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid, Doña SOLEDAD GARCIA GÓMEZ DE LAS HERA, Profesor Contratado Doctor del Área de Histología Humana y Anatomía Patológica del Departamento de Ciencias Básicas de la Salud de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y Don MARIANO GARCÍA ARRANZ, Profesor asociado del Departamento De Cirugía De La Facultad De Medicina De La Universidad Autónoma De Madrid.

CERTIFICAN:

Que Don Jesús Álvarez García, Médico Adjunto del Servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Ruber Quironsalud Juan Bravo 39 ha estado trabajando bajo su dirección en el proyecto titulado “Tratamiento Alogénico Con Células Troncales Mesenquimales Sobre La Isquemia Critica En Un Modelo Murino Diabético”, que ha sido desarrollado en la Unidad de Investigación de la Fundación Biomédica del hospital universitario La Paz, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne a su juicio las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesario para que pueda ser sometido a su lectura y discusión ante el tribunal.

Madrid 10 de Agosto de 2017.

Fdo. Prof. Riera del Moral

Director de Tesis

Fdo. Prof. García Gómez de las Heras

Co-directora de Tesis

Fdo. Dr. Prof. García Arranz

Tutor de Tesis

*A mi mujer, Pao.  
Contigo todo es posible.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer en primer lugar a mi director de tesis, D. Luis Felipe Riera del Moral, cuya ilusión por enseñar, innovar e investigar, impregna a los que estamos a su alrededor y nos anima a seguir adelante.

También a D. Mariano García Arranz y D<sup>a</sup> Soledad García Gómez de las Heras cuyos conocimientos y experiencia me han orientado en los momentos de duda.

A todo el personal del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital La Paz, y en especial a D<sup>a</sup> Carlota Largo Aramburu y a D Juan Víctor Caz Bonillo, quienes me guiaron en la fase experimental de este proyecto.

No podría faltar agradecer a mi familia que siempre me ha apoyado a pesar de mis errores con todo su amor y que me sirven de ejemplo en la vida con su capacidad de trabajo, su espíritu de superación.

Por último agradecer a mi esposa, Pao, que siempre me anima a emprender nuevos proyectos, aunque sea a costa de sus propios sacrificios, que me hace ser mejor persona y sin quien no quiero imaginarme la vida.

# ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| ÍNDICE  | I   |
| ABREVIATURAS                                      | II  |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                 | VII |
| ÍNDICE DE TABLAS                                  | XII |
| 1. INTRODUCCIÓN                                   | 1   |
| 1.1 LA ARTERIOPATÍA PERIFÉRICA                    | 2   |
| 1.2 INFLAMACIÓN Y ANGIOGÉNESIS                    | 5   |
| 1.3 LA TERAPIA CON CÉLULAS MADRE                  | 7   |
| 1.4 ESTADO DEL ARTE EN INVESTIGACIÓN CON ROEDORES | 18  |
| 1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO                     | 40  |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS                          | 43  |
| 2.1 HIPÓTESIS                                     | 44  |
| 2.2 OBJETIVOS                                     | 45  |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS                             | 46  |
| 3.1. PUESTA A PUNTO DEL MODELO EXPERIMENTAL       | 47  |
| 3.2. DESARROLLO DEL ESTUDIO                       | 52  |
| 4. RESULTADOS                                     | 71  |
| 4.1 DIFERENCIACIÓN DE ASCs                        | 72  |
| 4.2 FASE DE PUESTA A PUNTO                        | 74  |
| 4.3 FASE DE DESARROLLO DEL ESTUDIO                | 78  |
| 5. DISCUSIÓN                                      | 102 |
| 6. RESUMEN  | 115 |
| 7. CONCLUSIONES                                   | 118 |
| 8. BIBLIOGRAFÍA                                   | 120 |

# **ABREVIATURAS**

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| ACTH   | Hormona Adrenocorticotropa.   |
| ADN    | Ácido Desoxirribonucleico.  |
| AIC    | Arteria Iliaca Común.   |
| AINES  | Antiinflamatorios No Esteroideos.   |
| ASC    | Células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (Adipose Stem Cell).                       |
| aSMA   | Alfa Actina De Musculo Liso (Alpha Smooth Muscle Actin).  |
| ATK    | Protein-Kinasa B.   |
| bFGF   | Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (Basic Fibroblast Growth Factor).                            |
| BMP-2  | Proteína Morfogénica Ósea (Bone Morphogenic Protein).   |
| CD     | Cúmulo De Diferenciación o Antígenos De Diferenciación De Leucocitos (Cluster Of Differentiation).      |
| CEBA   | Comité Ético De Bienestar Animal.   |
| Cinc-a | Quimiotáctico inducido por citoquinas de neutrófilos .<br>(Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant) |
| CMA    | Células Madre Adultas.  |
| CMTA   | Células Madre De Tejido Adiposo.  |
| DiL    | Tinción DiL (dioctadecilindocarbocianina fluorescente).   |
| DM     | Diabetes Mellitus.  |
| DMEM   | Dulbecco's Modified Eagle Medium.   |
| EDTA   | Acido Etilendiaminotetraacético.  |
| EGF-A  | Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor).   |
| EPC    | Célula Progenitora Endotelial (Endothelial Progenitor Cell).  |
| ESC    | Célula Troncal Embrionaria (Embryonic Stem Cell).   |
| FBS    | Suero Bovino Fetal (Fetal Bovine Serum).  |
| Fc     | Fracción Constante De Inmunoglobulina.  |



|         |  |
|---------|--|
| FVE     | Fracción Vascular Estromal.  |
| GA      | Proteínas Activadoras de la GTPasa (GTP-Activating Proteins).                                    |
| Ga-GEFS | Factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Guanine Nucleotide Exchange Factor).            |
| GK      | Glycerol Kinase.   |
| GLUT    | Proteína Transportadora De Glucosa (Glucose Transporter).  |
| HGF     | Factor de Crecimiento de Hepatocitos (Hepatocyte Growth Factor).                                 |
| HLA     | Antígeno Leucocitario Humano (Human Leukocyte Antigen).  |
| HSC     | Célula Troncal Hematopoyética (Hematopoietic Stem Cell).   |
| Hz      | Hertzios.  |
| IAC     | Isquemia Arterial Crónica.   |
| IGF-1   | Somatostatina C (Insulin-Like Growth Factor).  |
| IgG     | Inmunoglobulina G.   |
| IL      | Interleukina.  |
| iPS     | Células Troncales Pluripotentes inducidas (Induced Pluripotent Stem Cells).                      |
| JAK     | Janus Kinasa.  |
| KDR     | Receptor dominio kinase (Kinase Insert Domain Receptor).   |
| LCA     | Antígeno Leucocitario Común.   |
| LCAM-1  | Cadherina E (Liver Cell Adhesion Molecule).  |
| LDL     | Lipoproteína de Baja Densidad (Low Density Lipoprotein).   |
| MACIF   | Factor Inhibidor del Complejo de Ataque de Membrana (Membrane Attack Complex Inhibitory Factor). |
| MCP     | Proteína Quimotáctica para Monocitos (Monocyte Chemoattractant Protein).                         |
| MIF     | Intensidad Media de Fluorescencia (Mean Intensity Of Fluorescence).                              |

|          |  |
|----------|--|
| MMP      | Matriz de Metaloproteasas (Matrix Metalloproteinase).  |
| MRTFs    | Factores de Transcripción Relacionado con Miocardio (Myocardin-Related Transcription Factors). |
| MSCs     | Célula Troncal Mesenquimal (Mesenchymal Stem Cells).   |
| mT       | Militesla.   |
| MyD88    | Gen de Diferenciación Mieloide 88 (Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88).          |
| NEP      | Endopeptidasa Neutra (Neutral Endopeptidase).  |
| NF-KB    | Factor kappa B (Nuclear Factor Kappa B).   |
| PBS      | Tampón salino fosfato (Phosphated-Buffered Saline).  |
| PDGF     | Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas (Platelet-Derived Growth Factor).              |
| PG2Fa    | Prostaglandina F2 Alpha.   |
| PGE2     | Prostaglandina E2.   |
| PI3K     | Fosfoinositol kinasa 3 (Phosphoinositol Kinase 3).   |
| PI3K-RAS | Fosfoinositol 3-Quinasas/Gtpasa RAS.   |
| RBP      | Proteína de unión al retinol (Retinol-Binding Protein).  |
| RhoA     | Proteína A homóloga a familia RAS (Ras Homolog Gene Family, Member A).                         |
| RI       | Respuesta Inmune.  |
| ROCK     | Kinasa asociada a RhoA (Rho-Associated Protein Kinase).  |
| SDF      | Stromal Cell-Derived Factor (Factor Derivado De Células Estromales).                           |
| SRF      | Factor de Respuesta Sérica (Serum Response Factor).  |
| SSEA     | Antígeno embrionario específico (Stage-Specific Embryonic Antigen).                            |
| STRO     | Antígeno De Células Estromales (STROmal antigen).  |
| STZ      | Estreptozotocina.  |
| TCR      | Receptor Para Células T (T-Cell Receptor).   |

|         |   |
|---------|---|
| Ter-119 | Anticuerpo Monoclonal Anti Células Eritroides.                                  |
| TGF-B   | Factor de crecimiento Transformador beta (Transforming Growth Factor Beta).     |
| Thy-1   | Antígeno de células del Timo (Thymus Cell Antigen).                             |
| TNFa    | Factor De Necrosis Tumoral Alfa (Tumoral Necrosis Factor Alpha).                |
| VCAM    | Molécula de Adhesión Vascular (Vascular Cell Adhesion Molecule).                |
| VEGF    | Factor De Crecimiento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor). |

# **ÍNDICE DE FIGURAS**

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Proceso arteriosclerótico.
- Figura 2. Reacción inflamatoria tras una lesión isquémica.
- Figura 3. Tipos de células troncales mesenquimales en función de su diferenciación. Modificado de la tesis doctoral del Dr. Riera del Moral “Tratamiento coadyuvante mediante células troncales mesenquimales de los aneurismas de aorta abdominal”. UAM 2013.
- Figura 4. Diferentes técnicas de isquemia experimental de la extremidad posterior en modelo murino. A. Esquema general de la vascularización de extremidad posterior en las ratas con dos ejes uno profundo (aortoiliaco) y otro superficial y muy desarrollado (mamario). B. Esquema del modelo utilizado en este trabajo. C. Esquema del modelo utilizado para la validación de pruebas de imagen. D. Esquema del modelo de Rochester de isquemia. E. Esquema del modelo de Tang de isquemia crónica. X identifican ligaduras y tijeras zonas de corte.
- Figura 5. Diferenciación de células mesenquimales hacia células endoteliales. Modificado de “Mesenchymal stem cells and vascular regeneration”. VEGF, activa los receptores PDGFR y VEGFR, IGF, se une a IGF1R y los estímulos mecánicos activan integrinas, produciendo cambios epigenéticos a través de varias vías de señalización.
- Figura 6. Diferenciación de células mesenquimales a células musculares lisas. Modificado de “Mesenchymal stem cells and vascular regeneration”. La trombina, TGF, S1P, y BMP (proteínas de morfología ósea) activan el GPCR que inicia la cascada RhoA-ROCK, que termina con la polimerización de G-actina. Los factores de

transcripción relacionado con la miocardina (MRTFs) junto con la G-actina, se traslocan al núcleo, y activan la expresión de genes de células musculares lisas mediante la unión de los elementos SRF-CArG.

- Figura 7. Fotografías de lesiones necróticas, contractura y auto-amputación digital secundarias a la isquemia.
- Figura 8. A. Obtención quirúrgica de grasa de pared abdominal. B. Pieza de tejido adiposo obtenido.
- Figura 9. A. ASC tras 1 hora de siembra. B. ASC confluentes y adheridas a plástico tras 4 días.
- Figura 10. Fotografías intraoperatorias de las zonas de ligadura. A la derecha exposición trasperitoneal de paquete vascular iliaco común izquierdo ligado y seccionado. A la izquierda exposición y ligadura de paquete vascular femoral y ramas tributarias.
- Figura 11. Citometría de flujo que demuestra valores positivos para CD90, CD105 y CD29 y valores negativos para CD34, HLA DR y CD45.
- Figura 12. A. Diferenciación adipogénica en la que se evidencia la acumulación de lípidos a través de tinción Oil Red O. B. Diferenciación osteogénica: a través de una tinción Rojo Alzarina se muestran los depósitos ricos en calcio secretados a la matriz extracelular por los osteocitos.
- Figura 13. Supervivencia acumulada del grupo largo con diabetes e isquemia y tratadas con células troncales mesenquimales.
- Figura 14. Evolución de los pesos durante el seguimiento a largo plazo.
- Figura 15. Evolución del estado general en el grupo de seguimiento a largo plazo.

- Figura 16. Evolución de la clínica isquémica en el grupo de seguimiento a largo plazo.
- Figura 17. Comparación del estado general entre casos y controles, con escala cualitativa ordinal. Normalidad está definida por el valor 0.
- Figura 18. Curvas de evolución clínica general de grupo control.
- Figura 19. Curvas de evolución clínica general de grupo caso.
- Figura 20. Valores porcentuales de ratas que presentaron mejoría general en relación al tratamiento con ASC o no.
- Figura 21. Comparación del estado de isquemia entre casos y controles, con escala cualitativa ordinal. La normalidad está definida por el valor 0.
- Figura 22. Curvas de evolución clínica isquémica de grupo control.
- Figura 23. Curvas de evolución clínica isquémica de grupo casos.
- Figura 24. Valores porcentuales de ratas que presentaron mejoría isquémica en relación al tratamiento con ASC o no.
- Figura 25. Hematoxilina-eosina de la zona cicatricial a 20x. A. Grupo de seguimiento corto sin ASC. Tejido conjuntivo laxo con gran número de células inflamatorias (flechas). B. Grupo de seguimiento corto con ASC. Tejido conjuntivo laxo con poco infiltrado de células inflamatorias (flechas). C. Grupo de seguimiento largo con ASC. Tejido conjuntivo denso irregular con un mínimo infiltrado inflamatorio (flechas).
- Figura 26. Infiltrado inflamatorio de la zona cicatricial de los grupos cortos en campo de 40x.
- Figura 27. Inmunohistoquímica PAAP anti-CD-68 (macrófagos M1) y anti-CD206 (macrófagos M2) de zona cicatricial, en los que los macrófagos se encuentran marcados con tonos marrones, de los grupos corto sin ASC, corto con ASC y largo con ASC de la zona

cicatricial. 20x.

- Figura 28. Inmunohistoquímica PAAP anti-CD-68 (macrófagos M1) y anti-CD206 (macrófagos M2) de zona cicatricial, en los que los macrófagos se encuentran marcados con tonos marrones, de los grupos cortos sin ASC y corto con ASC en los ganglios linfáticos regionales. 20x.
- Figura 29. Hematoxilina-eosina de la zona cicatricial. Valoración de la vascularización (capilares y arteriolas neoformadas (asteriscos)). Grupo de seguimiento corto sin ASC. Tejido conjuntivo laxo con gran número de células inflamatorias (flechas). B. Grupo de seguimiento corto con ASC. 20x.



# **ÍNDICE DE TABLAS**

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Adipocinas del tejido graso. Modificado de “Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria”. \*RI Respuesta inmune. CMTA Células troncales mesenquimales de tejido adiposo. FVE fraccion vascular estromal.
- Tabla 2. Marcadores de superficie característicos de las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo. Modificado de Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria.
- Tabla 3. Resumen de diferentes tipos de modelos de diabetes experimental.
- Tabla 4. Biomodelos espontáneos de DM tipo 2 con hiperglucemia severa.
- Tabla 5. Biomodelos espontáneos de DM tipo 2 con hiperglucemia moderada.
- Tabla 6. Biomodelos con disminución de la tolerancia a la glucosa.
- Tabla 7. Modelos análogos de DM.
- Tabla 8. Modelos intrínsecos de DM.
- Tabla 9. Modelos de DM asociados y no asociados a obesidad.
- Tabla 10. Modelos de DM experimental por susceptibilidad genética a la dieta.
- Tabla 11. Escala ordinal de clínica secundaria a la isquemia.
- Tabla 12. Escala clínica de isquemia y estado general generada a raíz de la experiencia previa y utilizada durante la fase experimental.
- Tabla 13. Dosis y volumen de estreptozotocina utilizados en la 2º

experiencia previa a la fase de experimentación.

- Tabla 14. Glucemias obtenidas tras la inducción con estreptozotocina con y sin ayunas., en 2º experiencia previa. \* ratas que superaron el criterio de diabetes sin ayunas (glucemia superior a 200mg/l). + Ratas que superaron el criterio de diabetes en ayunas (glucemia superior a 150mg/l).
- Tabla 15. Escala de seguimiento clínico utilizada durante la 2º experiencia previa.
- Tabla 16. Pesos de la rata y de las extremidades desarticuladas en 2º experiencia previa.
- Tabla 17. Pesos, glucemias con y sin anestesia y cantidad de estreptozotocina utilizada en 3º experiencia previa.
- Tabla 18. Ratas utilizadas en la fase experimental a largo plazo, glucemias y criterio de diabetes.
- Tabla 19. Variables descriptivas de las ratas utilizadas en la fase experimental.
- Tabla 20. Comparación mediante U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon de los pesos y glucemia de los grupos casos y controles de la fase experimental. <sup>a</sup>. No corregido para empates.
- Tabla 21. Estudios de supervivencia en grupo casos y controles.
- Tabla 22. Comparación de medias independientes relativas a la clínica general ajustada la mortalidad.
- Tabla 23. Evolucion clínica y valoración de la mejora final en función de las curvas de tendencia.
- Tabla 24. Comparación de proporciones de mejora de clínica general ajustadas a mortalidad.
- Tabla 25. Comparación de medias independientes relativas a la clínica isquémica ajustada la mortalidad.

- Tabla 26. Evolución de la isquemia y valoración final de mejora.
- Tabla 27. Comparación de proporciones de mejora de clínica isquémica ajustadas a mortalidad.
- Tabla 28. Recuento del infiltrado inflamatorio de la zona cicatricial en campo de 40x.
- Tabla 29. Tabla resumen de la neovascularización con recuento de arteriolas, capilares y de capilares por cada 50 fibras musculares.

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### ***1.1 LA ARTERIOPATÍA PERIFÉRICA Y LA ATEROSCLEROSIS***

La disminución de flujo arterial en las extremidades inferiores, llamada arteriopatía periférica o isquemia arterial crónica (IAC), afecta al 4.3% de la población, aunque en diabéticos puede alcanzar cifras de hasta el 7,5% entre los 60 y 64 años (1,2). Esta entidad es una afectación localizada de una enfermedad sistémica: la aterosclerosis.

La aterosclerosis, término introducido por Marchad en 1904, es la enfermedad derivada de la formación de placas de ateroma en la capa íntima de la arteria. Esta enfermedad puede generarse en la infancia y progresar con la edad (3,4).

Hay tres teorías sobre cómo se origina la aterosclerosis. Por un lado, la teoría lipídica, en la que el exceso de colesterol es el que produce un proceso inflamatorio en el espacio subendotelial. Los beneficios que se obtienen con la terapia hipolipemiente vendrían a avalar esta teoría (5).

Por otro lado encontramos la teoría del daño endotelial, en la que una agresión al endotelio, ya sea física, biológica o química, puede ser el desencadenante de la aterogénesis (6).

Por último tenemos la teoría monoclonal, en la que la multiplicación clonal y subintimal de un precursor de célula muscular lisa, sería la causa de las lesiones ateroscleróticas (7).

Aunque cada teoría tiene sus puntos a favor, la explicación más

ampliamente aceptada es la que implica a los factores de riesgo cardiovascular. Estos factores, interactuarían con el endotelio produciendo su disfunción o activación, que implica un aumento de la permeabilidad, del metabolismo oxidativo y de la acumulación de colesterol de baja densidad (LDL) bajo el endotelio.

El endotelio activado produce la oxidación de LDL, creando radicales libres de oxígeno y metabolitos oxidados que son proinflamatorios y proaterogénicos (8).

Además, se estimula la expresión de moléculas de adhesión, iniciándose el proceso inflamatorio y la liberación de factores de crecimiento y citoquinas que atraen a los macrófagos circulantes (9,10).

En lo referente a la historia natural de la arteriopatía periférica se pueden diferenciar tres estadios: La enfermedad asintomática, la claudicación intermitente y la isquemia crítica.

La isquemia crítica es la situación más grave y se describe como dolor en la extremidad, aún estando en reposo, sin alivio a pesar de correcto tratamiento analgésico con AINES y opiáceos durante más de 3 semanas y/o la aparición de lesiones tróficas. Esta situación se suele correlacionar con una presión en tobillo de  $<50\text{mmHg}$  o con una presión en 1º dedo de  $<30\text{mmHg}$  (1).

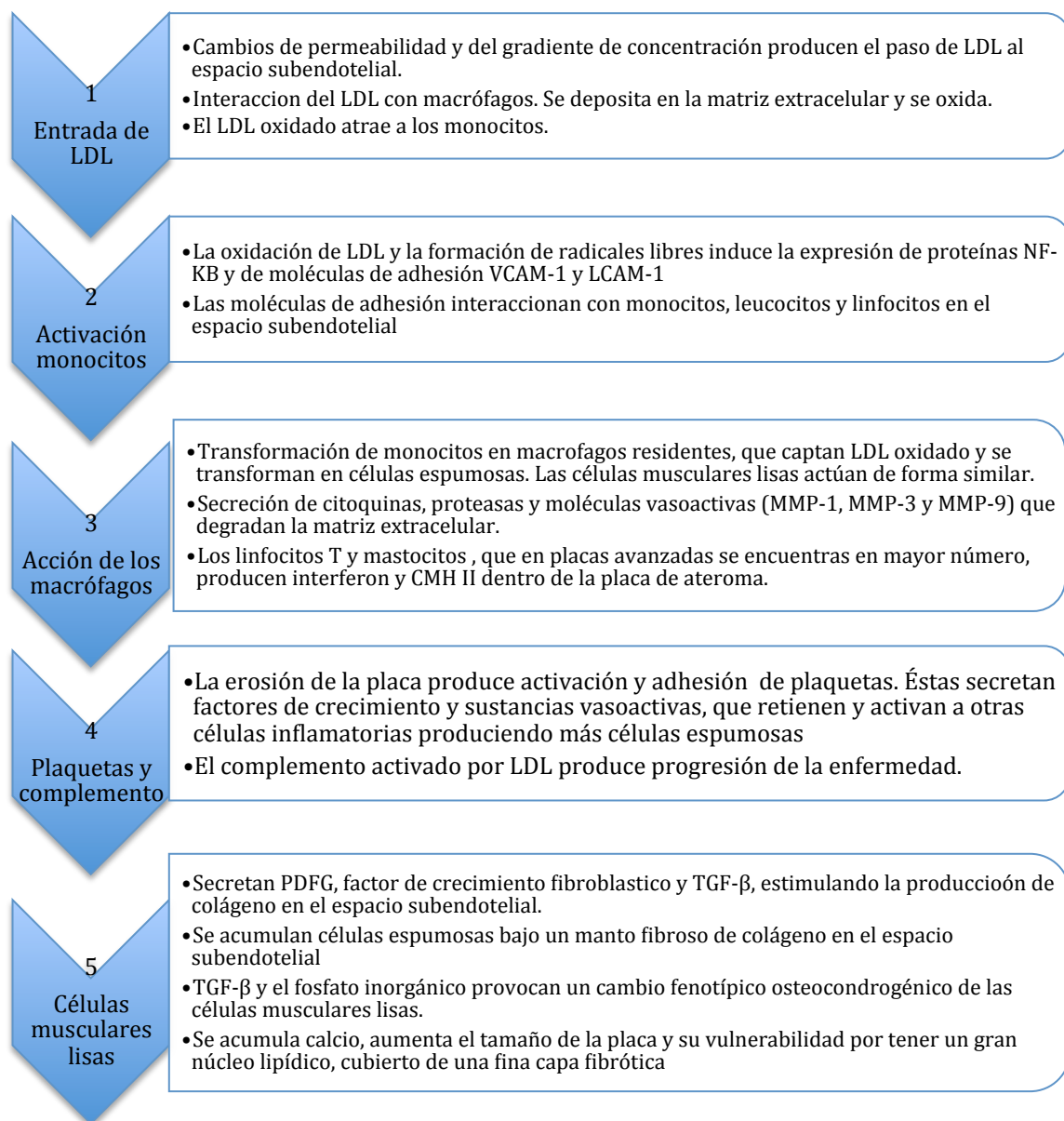


Figura 1. Proceso arteriosclerótico

Las expectativas pronósticas de la IAC en estadio crítico son muy malas, con tasas de amputación mayor y muerte en el primer año de aproximadamente el 25% si no se realiza un tratamiento revascularizador (11). El tratamiento actual de esta entidad es la revascularización, ya sea a través de cirugía derivativa, plastias y endarterectomías, o mediante procedimientos endovasculares: angioplastias con o sin *stent*. No obstante en determinados pacientes estas técnicas no pueden realizarse, por las



características de las lesiones o por las del paciente. En estos casos, para el tratamiento del dolor y de las lesiones tróficas, debe utilizarse como última opción la amputación del miembro. Ésta conlleva una agresión grave al paciente, con un deterioro severo de la calidad de vida, una alta morbilidad postoperatoria y un alto gasto sanitario (11–13). El tratamiento con células pluripotenciales puede ser una opción para estos pacientes no revascularizables.

## 1.2 INFLAMACIÓN Y ANGIOGÉNESIS

Tras la isquemia por oclusión arterial se produce una reacción inflamatoria aguda cuya finalidad es la reparación del tejido dañado, bien restableciendo el parénquima original, bien creando un tejido fibroso sustitutivo. Esta inflamación está mediada por gran cantidad de moléculas y tipos celulares, siendo los más importantes para la angiogénesis los neutrófilos, macrófagos y mastocitos.

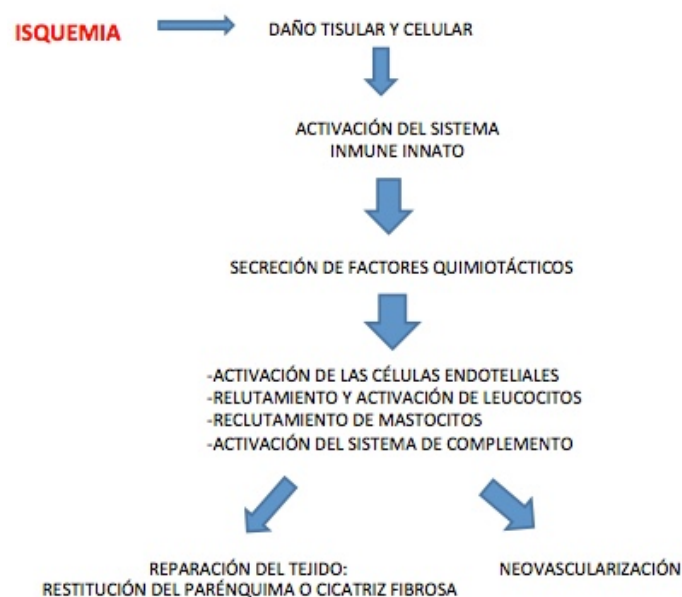


Figura 2. Reacción inflamatoria tras una lesión isquémica

### *Los Neutrófilos*

Los neutrófilos son los primeros leucocitos en llegar. Son células de vida media corta y características de la fase aguda de la inflamación. Al activarse secretan *in-situ* numerosas citoquinas quimiotácticas dirigidas a diferentes estirpes celulares.

Entre esas citoquinas secretadas por los neutrófilos activados está la esfingosina-1 que provoca la llamada de los macrófagos.

### *Los Macrófagos*

Estas células del sistema mononuclear fagocítico son células con una gran plasticidad y su estado de activación depende de las señales del microambiente en el que se encuentren (14,15). Se pueden diferenciar y activar por dos vías diferentes:

- Macrófagos activados por la “vía clásica” o macrófagos M1, que responden a citoquinas como IL-1, IL-12, IL-18 y TNF-beta, y cuyo papel es el de estimular y perpetuar la inflamación.
- Macrófagos activados por la “vía alternativa” o macrófagos M2, que responden a citoquinas como IL-4, IL-3 e IL-10 y que crean ambientes antiinflamatorios e inmunomoduladores que favorecen la resolución de la inflamación y la regeneración tisular.

### *Los Mastocitos*

La reacción inflamatoria también estimula la angiogénesis de la región dañada para restablecer el flujo sanguíneo, pudiéndose recuperar el metabolismo celular y que el tejido vuelva a ser funcional. De esta forma,

alrededor del foco isquémico se desarrolla una circulación colateral como mecanismo compensatorio. La secreción *in-situ* de citoquinas y factores de crecimiento angiogénicos tiene un papel clave en este proceso.

Los mastocitos reclutados hacia el foco inflamatorio son una fuente de factores de crecimiento estimulantes de la angiogénesis.

En tejidos tumorales, los mastocitos han sido ampliamente estudiados e incluso se ha valorado la posibilidad de evitar su presencia como posible mecanismo terapéutico, dada su importancia en el proceso de neovascularización (16).

Se ha descrito su utilidad en un frente inflamatorio post-isquémico tras una oclusión arterial aguda (17). Diferentes factores quimiotácticos secretados en ese foco provocan la migración y activación de mastocitos. La densidad de éstos en el foco alcanza un alto nivel a los 5 días con el pico máximo a los 15 días. Algunos de estos factores quimiotácticos son IL-3, IL-4, IL-9, IL-10 y TGF-beta. De entre ellos los más potentes son IL-3, IL-4 y la IL-10.

### ***1.3 LA TERAPIA CON CÉLULAS TRONCALES***

A principios del siglo XX Maximow describió en su hipótesis de la hematopoyesis unitaria el concepto de células madre. Esta teoría descrita a partir de un modelo observacional, se demostró cierta con el paso del tiempo (18–20).

Posteriormente, tras la Segunda Guerra Mundial, se empezó a investigar sobre los daños tisulares debidos a emisiones nucleares. En este contexto se identificaron las llamadas unidades formadoras de colonias en los bazo de ratones irradiados, procedentes de la médula ósea de ratones donantes. Estas unidades eran capaces de regenerar la estirpe celular sanguínea (21). Las primeras células madre descritas como tales fueron las de médula ósea y las hematopoyéticas (22). Posteriormente se descubrieron células pluripotentes en la masa celular interna del blastocisto embrionario, a las que se denominaron células madre embrionarias (23,24), y por último en multitud de tejidos adultos, como son el tejido neural (25), el músculo esquelético (26,27), la epidermis (28), músculo cardíaco (29), el páncreas (30), el intestino (31), el hígado (32), la córnea (33), la placenta (34) y el tejido adiposo (35).

### **1.3.1 Qué es una célula madre**

Una célula madre es aquella que tiene capacidad de auto-regeneración, viabilidad a largo plazo y potencialidad para producir diferentes tipos celulares (18).

Debe sus propiedades a su capacidad para dividirse de dos formas diferentes. Por un lado puede hacerlo de forma simétrica, comportándose las dos células hijas como nuevas células madre. Por otro lado tenemos la división asimétrica, en la cual una de las células hijas mantiene las características de la célula madre, mientras que la otra se va diferenciando hacia una estirpe celular diferente o comprometida.

### 1.3.2 Qué tipos de células madre existen

Las células madre se clasifican en función de su origen y de su potencialidad.

En función de su origen podemos dividir las en

- Células madre embrionarias (ESCs) a pesar de su gran potencialidad, tienen una aplicación clínica limitada debido a los conflictos éticos derivados del uso de embriones humanos, a la posibilidad de rechazo inmunológico frente a las células trasplantadas (36) y a su elevado potencial onco-teratogénico (37).
- Células pluripotentes inducidas (iPS): Obtenidas a través de técnicas de ingeniería genética, que logran la desdiferenciación de células adultas maduras (38,39). No obstante todavía no se ha podido controlar el proceso de reprogramación ni su elevada capacidad teratogénica.
- Células mesenquimales troncales adultas: Encontradas en el organismo adulto en diferentes tejidos y con la capacidad de producir nuevas células del tejido del que son parte (40).

En función de su potencialidad se pueden dividir en:

- Células Totipotenciales: capaces de diferenciarse en células germinales, tejidos somáticos y tejidos extraembrionarios. Únicamente el cigoto y las células derivadas de sus dos primeras divisiones son consideradas totipotentes.
- Células Pluripotenciales: incapaces de diferenciarse en células germinales, pero pudiendo diferenciarse a cualquier estirpe celular somática (ectodermo, mesodermo y endodermo), exceptuando las estructuras extraembrionarias (placenta, corion, saco vitelino, alantoides y amnios).

- Células Multipotenciales : Sólo capaces de diferenciarse a tejidos derivados de su misma lámina embrionaria.
- Células Oligopotenciales o Unipotenciales: Específicas de un linaje y capaces de dar unos pocos tipos celulares (41).

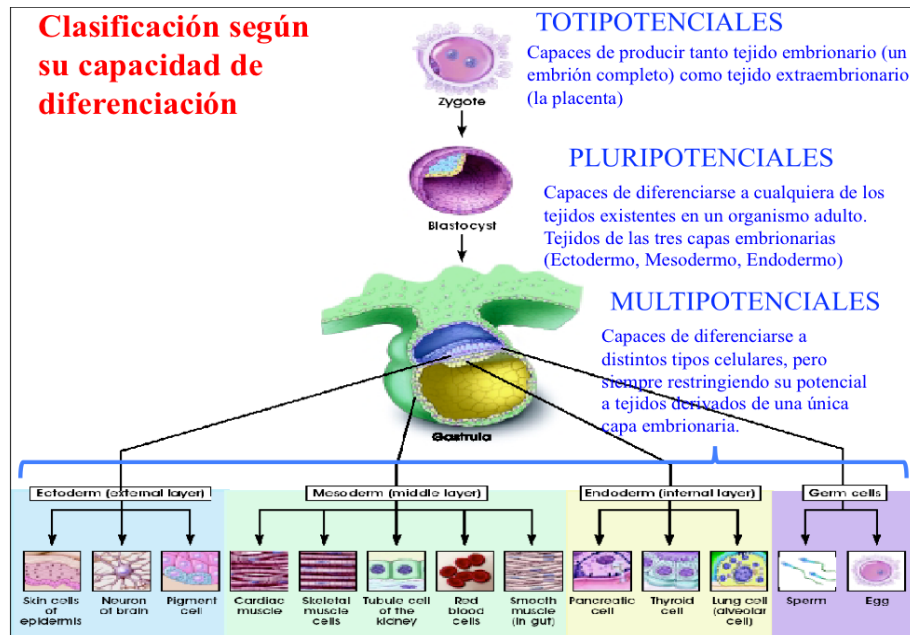


Figura 3. Tipos de células troncales en función de su diferenciación. Modificado de la tesis doctoral del Dr. Riera del Moral “Tratamiento coadyuvante mediante células troncales mesenquimales de los aneurismas de aorta abdominal”. UAM 2013.

### 1.3.3 Qué características tienen las células madre adultas (CMA)

Las CMA son células pluripotenciales que pueden encontrarse desde la formación del blastocisto a los 4 días de desarrollo embrionario, hasta la edad adulta en los diferentes tejidos que derivan de las tres hojas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) (42).

Estas células no generan problemas éticos y aunque tienen menos potencial que las células madre embrionarias, diferentes estudios nos muestran su pluripotencialidad.

El tejido más representativo de las CMA es la médula ósea, que deriva del mesodermo, y que está compuesta por nichos de células mesenquimales troncales hematopoyéticas (HSC) en un estroma mesenquimal de soporte.

Este estroma es heterogéneo, con células de diferentes estirpes. Un grupo celular en particular son las llamadas células troncales mesenquimales. Dichas células tienen la capacidad para diferenciarse en poblaciones derivadas del mesodermo (adipocitos, fibroblastos, osteocitos, condrocitos y miocitos) (43) y en otras estirpes celulares derivadas del ecto y del endodermo mediante técnicas de laboratorio (neuronas, células endocrinas pancreáticas, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos (35,44). No obstante otros tejidos adultos tienen también dichas células a modo de reserva, posiblemente con fines reparadores (45).

Desde un punto de vista terapéutico, el uso de un determinado tipo de célula troncales mesenquimales debe cumplir una serie de criterios a tener en cuenta (46):

- Abundancia: Deben ser muy abundantes (millones o billones de células).
- Seguridad para el donante: El procedimiento por el cual se obtienen debe ser fácil y con poca morbilidad.
- Pluripotencialidad regulada: Deben ser capaces de diferenciarse a múltiples líneas celulares de manera reproducible y regulada.
- Seguridad para el receptor: El trasplante de forma autóloga y/o alogénica debe ser seguro para el organismo receptor.
- Producción: Su producción debe ser fácil y reproducible.

De entre los tejidos adultos de los que se pueden obtener células mesenquimales, el tejido adiposo blanco se presenta como un gran candidato, debido a que su obtención es fácil y poco dolorosa y por regla general se trata de un tejido redundante (47,48).

#### **1.3.4 Qué características tienen las células troncales mesenquimales de la grasa**

El tejido graso, de origen mesodérmico, tiene una gran densidad de MSCs, en su tejido de soporte o estroma, aproximadamente  $5 \times 10^5$  MSCs por gramo, siendo unas 500 veces superior a la de la médula ósea.

Aunque clásicamente se ha considerado un órgano de mero almacenamiento de energía, en la actualidad se ha comprobado que es un tejido multifuncional, con un papel endocrino y reservorio de células troncales mesenquimales. En la siguiente tabla se resumen las adipocinas secretadas por los diferentes tipos celulares del tejido adiposo.

| Adipocinas  | Función   | Célula secretora          |
|---|---|---------------------------|
| 11b-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1          | Metabolismo esteroideo  | Adipocitos, preadipocitos |
| Ácidos grasos libres                                | Metabolismo lipídico  | Adipocitos                |
| Adiponectina  | Aumenta la sensibilidad a la insulina, inflamación y arteriosclerosis | Adipocitos                |
| Adipsina y proteína estimuladora de acilación (ASP) | Estrés y respuesta inmunitaria  | Adipocitos, macrófagos M2 |



|  |  |   |
|--|--|---|
| Angiotensinógeno   | Homeostasis vascular   | Adipocito, FVE                                      |
| Apelina  | RI   | Adipocito, FVE,<br>macrófagos                       |
| Aromatasa  | Metabolismo lipídico   | Adipocitos, macrófagos                              |
| IGF-1  | Metabolismo lipídico y RI  | Adipocito, preadipocito,<br>CMTA                    |
| TNF $\alpha$   | Inflamación,<br>arteriosclerosis y RI  | Adipocitos, macrófagos<br>M1                        |
| Factor inhibidor de la<br>migración de<br>macrófagos (MIF) | Inflamación  | Adipocitos, CMTA,<br>células sistema<br>inmunitario |
| TGF $\beta$  | Adhesión y migración<br>celular, crecimiento y<br>diferenciación               | Adipocitos, FVE, CMTA                               |
| Hormonas esteroideas                                       | Metabolismo lipídico y RI  | Adipocitos, preadipocitos                           |
| PAI-1  | Homeostasis vascular   | Adipocitos, FVE                                     |
| IL-1   | Inflamación y RI   | Macrófagos M1                                       |
| IL-6   | Inflamación,<br>arteriosclerosis y RI  | Adipocitos, FVE                                     |
| IL-8   | Pro-aterogénesis   | Adipocitos, FVE                                     |
| IL-10  | Inflamación y RI   | Adipocitos, macrófagos<br>M2                        |
| Leptina  | Ingesta alimentaria,<br>reproducción,<br>angiogénesis y sistema<br>inmunitario | Adipocitos  |
| Lipasa sensible a<br>hormona                               | Metabolismo lipídico   | Adipocitos  |
| Lipoproteinlipasa  | Metabolismo lipídico   | Adipocitos  |
| Metalotioneína   | Estrés y respuesta<br>inmunitaria  | Adipocitos, FVE                                     |
| Monobutirina   | Angiogénesis   | Adipocitos  |
| Omentina   | RI   | FVE, macrófagos                                     |

|                                       |  |  |
|---------------------------------------|--|--|
| Perilipina                            | Metabolismo lipídico                               | Adipocitos                             |
| Prostaglandinas                       | Flujo sanguíneo, lipólisis, diferenciación celular | Adipocitos, CMTA                       |
| Proteína C reactiva                   | Inflamación, arteriosclerosis y RI                 | FVE                                    |
| Proteína de unión a los ácidos grasos | Metabolismo lipídico                               | Adipocitos, macrófagos                 |
| MCP-1                                 | Pro-aterogénesis y RI                              | Adipocitos, macrófagos M1              |
| CETP                                  | Metabolismo lipídico                               | Preadipocitos, adipocitos              |
| RBP                                   | Metabolismo lipídico                               | Adipocitos                             |
| Resistina                             | Inflamación y RI                                   | Adipocitos, macrófagos M2              |
| Trombospondina                        | Angiogénesis                                       | Adipocitos                             |
| Visfatina                             | RI   | Adipocitos, preadipocitos, neutrófilos |
| Glucoproteína cinc-a2                 | Metabolismo lipídico, cáncer y caquexia            | Adipocitos, FVE                        |

Tabla 1. Adipocinas del tejido graso. Modificado de “Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria” (49).

\*RI Respuesta inmune. CMTA Células madre de tejido adiposo. FVE fracción vascular estromal.

No obstante, cuando hablamos de tejido adiposo es importante recalcar las diferencias entre la grasa subcutánea y la visceral, teniendo el tejido adiposo visceral un perfil más angiogénico que el subcutáneo (50). Esto puede deberse a su diferente comportamiento en condiciones de exceso de energía, siendo hipertrófico el tejido visceral (aumentando el número de adipocitos), mientras que el tejido subcutáneo se comportaría de forma hiperplásica (aumento del tamaño de las vacuolas) (51).

Además los adipocitos diferenciados in vitro a partir de ASCs han demostrado tener características diferentes dependiendo de su tejido de origen (52–56).

Actualmente las células troncales derivadas de tejido adiposo se denominan ASCs (Adipose-derived Stem Cells) y deben tener las siguientes características (descritas en el *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*) (57):

- En condiciones de cultivo “*in-vitro*” deben ser capaces de adherirse al plástico.
- Deben expresar los marcadores de superficie CD105, CD29, CD44, CD73 y CD90 y no expresar CD45, CD34, CD133, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 ni moléculas de superficie HLA-II.
- Además han de ser capaces de diferenciarse en linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico.

Las ASCs tienen un perfil inmunológico privilegiado, al no presentar HLA II y una expresión de HLA I muy limitada, lo que hace que puedan utilizarse de forma alogénica. Del mismo modo, no presentan un marcador característico, sino que expresan marcadores de las MSC y de líneas no progenitoras (tabla 2).

| Marcadores presentes en ASCs                                  | Marcadores ausentes en ASCs                              |
|---|--|
| aSMA a-actina de músculo liso                                 | CD104 Integrina b4                                       |
| CD10 Endopeptidasa neutra                                     | CD106 Componente de la molécula de adhesión celular      |
| Molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1)                      | CD117 c-Kit  |
| CD105 Endoglina   | CD11b Integrina aM                                       |
| CD13 Alanina aminopeptidasa                                   | CD11c Integrina aX                                       |
| CD146 Molécula de adhesión celular de melanoma                | CD133 Prominina 1  |
| CD166 Molécula de adhesión celular de activación leucocitaria | CD14   |
| CD24 Antígeno estable al calor                                | CD144  |
| CD29 Integrina b1   | CD15 Antígeno específico del estado embrionario (SSEA-1) |
| CD44 Ácido hialurónico/receptor de fibronectina               | CD16 Receptor Fc para IgG                                |

|   |   |
|---|---|
| CD49da Integrina $\alpha 4$   | CD19 Antígeno de superficie B4 de los linfocitos B                              |
| CD49e Integrina $\alpha 5$  | CD3 Receptor de células T (TCR)   |
| CD54a Molécula de adhesión intercelular-1                           | CD31 Molécula de adhesión de plaquetas y endotelio                              |
| CD55 Factor acelerador de la degradación (DAF) del complemento      | CD33  |
| CD58  | CD34  |
| CD59 Factor de inhibición del complejo de ataque a membrana (MACIF) | CD38  |
| CD71 Receptor de transferrina                                       | CD4 Correceptor HLA de clase II   |
| CD73 Ecto-5'-nucleotidasa   | CD45 Antígeno leucocitario común (LCA)  |
| CD9 CD45 Antígeno leucocitario común (LCA)                          | CD56 Molécula de adhesión celular neural  |
| CD90 Antígeno-1 de las células del timo (Thy-1)                     | CD61 Integrina $\beta 3$  |
| HLA-I Antígeno leucocitario humano clase I (A, B, C)                | CD62E E-selectina   |
| Sca-1 Antígeno 1 de las células madre,                              | P-selectina   |
|   | Inmunoglobulina asociada alfa   |
|   | CD80 B7.1   |
|   | Glicoforina A   |
|   | HLA-DR  |
|   | Linc: Antígeno de linaje CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, Ter-119, y Gr-1. |
|   | MyD88   |
|   | Stro-1  |
|   | VEGFR2 Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2                 |

Tabla 2. Marcadores de superficie característicos de las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo. Modificado de Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria (49).

Estas células, tienen potencial “*in-vitro*” de diferenciación a diferentes tejidos mesodérmicos (58) y son capaces de perpetuarse mediante autorrenovación. También secretan citoquinas y factores de crecimiento con propiedades antiinflamatorias, angiogénicas, antiapoptóticas e inmunomoduladoras (59).

Los más estudiados son el factor de crecimiento para el endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento para hepatocitos (HGF) y el factor de

crecimiento-1 semejante a insulina (IGF-1), implicados en la angiogénesis, la cicatrización, la reparación tisular y modulación de la secreción de metaloproteasas (60).

### **1.3.5 Cómo se espera que funcionan las células mesenquimales de la grasa en la isquemia**

En la sangre periférica y en la médula ósea encontramos células progenitoras endoteliales o EPC (61,62).

Ante una agresión isquémica los tejidos liberan diversos factores de crecimiento y citoquinas (VCAM, VEGF...) (63) que estimulan la liberación, la activación y la diferenciación de las EPC a células endoteliales que conformarán neovasos. Se ha probado que el ejercicio físico y las estatinas también estimulan a las EPC (64).

Las EPC también tienen un papel paracrino, siendo capaces de liberar factores y citoquinas proangiogénicos desde el intersticio de los tejidos isquémicos lesionados y dirigiendo la angiogénesis hacia las zonas más afectadas.

La terapia con ASCs tiene por objetivo suplir el déficit de células progenitoras endoteliales circulantes en sangre periférica que se encuentran disminuidas y disfuncionales en los pacientes con arteriopatía periférica, especialmente en los pacientes diabéticos (65,66), ya que las ASCs aumentan la secreción de factores proangiogénicos y antiapoptóticos en condiciones de isquemia (67).

Hasta la fecha, existen más estudios científicos sobre la capacidad de las células troncales derivadas de la médula ósea para mejorar la clínica de isquemia de miembros inferiores que sobre las ASCs (68). Aún así, se espera que las ASCs puedan actuar tanto de una forma directa diferenciándose en células endoteliales, como de forma indirecta, con la liberación de factores y citoquinas, como si de EPC se trataran, promoviendo la neovascularización y el reclutamiento de células troncales endógenas.

#### ***1.4. ESTADO DEL ARTE EN INVESTIGACIÓN CON ROEDORES***

##### **1.4.2. Modelos de diabetes experimental**

###### ***Introducción***

La diabetes mellitus engloba un grupo heterogéneo de entidades fisiopatológicas caracterizadas por una resistencia aumentada a la acción periférica de la insulina y un deterioro de la secreción hormonal por parte de las células beta pancreáticas (69).

A pesar del amplio interés que genera la diabetes mellitus en la comunidad científica, aún persisten múltiples incógnitas acerca de su fisiopatología, lo que hace preciso el uso de modelos experimentales para poder ampliar nuestro conocimiento (69).

La heterogeneidad en la fisiopatología de la diabetes implica la existencia de distintos modelos experimentales. Encontramos modelos subcelulares, celulares, orgánicos, tisulares y de organismos íntegros. Cada modelo experimental tiene sus propias limitaciones: Los modelos subcelulares

valoran la actividad enzimática y cuantifican una reacción determinada, presentando situaciones lejanas a la realidad clínica. Del mismo modo los modelos celulares u orgánicos proporcionan una información limitada, sin tener en cuenta la interrelación que se produce dentro del organismo. Los animales íntegros son los modelos más completos, si bien también pueden ser los más difíciles de interpretar. Sobre estos últimos, los animales seleccionados genéticamente serían los mejores al darnos una situación estandarizada, aunque son muy costosos (70,71).

Los modelos más frecuentemente utilizados son los organismos íntegros con inducción química de la diabetes, bien con aloxano, bien con estreptozotocina, seguidos de los animales seleccionados genéticamente. Dentro de los modelos que no utilizan animales íntegros los más empleados son los Kits comercializados que determinan la actividad enzimática (70–73).

### Modelos Animales

Se debe tener en cuenta que son pocos los mamíferos superiores, perros, gatos y algunos primates, en los que se ha estudiado en profundidad esta enfermedad y sus consecuencias. Este hecho unido a lo costoso que es su manutención, hace que sean los roedores de laboratorio, ampliamente estudiados, de bajo costo y fácil reproducción, los animales más propicios y los que más información han aportado a la investigación de la diabetes (74–77).

Existen múltiples clasificaciones de los diferentes modelos animales de diabetes. En función de cómo se producen se pueden diferenciar entre formas espontáneas y formas inducidas (tabla 3).

|                     |                             |  |
|---------------------|-----------------------------|--|
| Modelos Espontáneos | En función de hiperglucemia | Hiperglucemia severa<br>Hiperglucemia moderada<br>Con disminución de la tolerancia a hidratos de carbono                               |
|                     | En función de analogía      | Modelos análogos<br>Modelos intrínsecos  |
|                     | En función del metabolismo  | Animales no obesos<br>Animales obesos<br>Animales con efectos dietéticos   |
| Modelos Inducidos   |                             | Inducidos quirúrgicamente<br>Inducidos hormonalmente<br>Inducidos inmunológicamente<br>Inducidos químicamente<br>Manipulación genética |

Tabla 3. Resumen de diferentes tipos de modelos de diabetes experimental.

## Modelos Espontáneos

### *En función de los niveles de glucemia*

- Biomodelos espontáneos de DM tipo 2 con hiperglucemia severa:

|          |   |
|----------|---|
| Ratón    | db/db, C57BL/Ksj, Spiny (Acomys cahirinus)          |
| Rata     | fa/fa, OLEFT, Sand, Obesa BBZ/wor                   |
| Hámster  | Hámster Chino, Hámster húngaro. Hámster sudafricano |
| Conejo   | Conejo Nueva Zelanda                                |
| Curiel   | Curiel Hartley                                      |
| Primates | Mono Rhesus, Celebes black                          |

Tabla 4. Biomodelos espontáneos de DM tipo 2 con hiperglucemia severa (78).

Los animales desarrollan una hiperglucemia moderada con progresión hacia niveles severos ( $>20\text{mmol/L}$ ). Se acompaña de hiperinsulinemia, pérdida de peso y en ocasiones cetosis. Pueden requerir insulina ocasional (78).



- Biomodelos espontáneos de DM tipo 2 con hiperglucemia moderada:

|       |  |
|-------|--|
| Ratón | Ratón japonés KK, machos Bristol CBA/Ca, ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO), VSTOCK, ASTON C57BL/6J, obeso amarillo, tuco-tuco, híbrido Wellesley. |
| Ratas | Rata Cohen diabética, GK (goko-kakisaki), Machos Ess, Machos wiky obesos, machos Wistar WBN/kob, machos ZDF, SHR/Ncp                               |

Tabla 5. Biomodelos espontáneos de DM tipo 2 con hiperglucemia moderada (78).

Se comportan con niveles de glucemia menores a los 20mmol/L, sin presentar cetosis. Suelen asociar obesidad, hiperfagia, hiperplasia de células beta, hiperinsulinemia y resistencia a insulina. Los más representativos son la rata obesa Zucker y los ratones obesos. Suele transmitirse por herencia autosómica recesiva simple aunque los hay poligénicos (ratón KK y NZO) y autosómica dominante (Ratones Ay) (78).

- Biomodelos con disminución de la tolerancia a la glucosa:

|          |  |
|----------|--|
| Ratón    | Ratones con las mutaciones ob , Db, Tub, Fat.<br>Ratones envejecidos.                        |
| Rata     | Rata obesa Zucker fa/fa, Rata amarilla Ay, Mutación Cp. Ratas envejecidas, BHE, Zucker fa/fa |
| Gerbil   | Gerbil de Mongolia   |
| Primates | Mono ardilla   |
| Cerdo    | Cerdo Yucatán miniatura  |

Tabla 6. Biomodelos con disminución de la tolerancia a la glucosa (78).

Estos especímenes tienen una secreción insulínica disminuida y/o una resistencia periférica a la acción de la insulina.

Son útiles como modelos de insulinoresistencia y para investigar el origen de la hiperfagia y a hiperinsulinemia. Tanto la rata fa/fa como el ratón

ob/ob, tienen disminuido el estímulo termogénico en tejido adiposo marrón (78)

*En función de la analogía*

- Modelos análogos:

|       |   |
|-------|---|
| Ratón | Ratón: Goto-Kakizaki (GK), Obeso de Nueva Zelanda (NZO), Ratón KK |
| Rata  | Rata: Sand o Psammomys obesus, rata OLETF.                        |

Tabla 7. Modelos análogos de DM (78).

Los modelos análogos pretenden imitar la enfermedad humana. Los más conocidos y usados son el ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO) que presenta un nivel umbral en que la tasa de adiposidad precoz establece un nivel diabetogénico de resistencia a la insulina (79) y la rata Goto-Kakizaki, derivada de múltiples cruces endogámicos de ratas Wistar y que reproduce los principales rasgos de la enfermedad humana (69).

- Modelos intrínsecos:

|       |   |
|-------|---|
| Ratón | Ratón db/db, ratón ob/ob, ratón agouti. |
| Rata  | Rata Zucker fa/fa                       |

Tabla 8. Modelos intrínsecos de DM (78).

Los modelos intrínsecos sirven para contestar preguntas concretas de aspectos específicos (69).

*En función de su metabolismo*

- Asociados o no a obesidad:

Hay modelos experimentales que tienen en cuenta la relación entre obesidad y diabetes, mientras que otros no. Por regla general la obesidad es común en roedores de laboratorio, aunque también es cierto que tienden a presentar reversión espontánea de su diabetes (80,81).

|                    |  |
|--------------------|--|
| Animales no obesos |  |
| Rata               | Rata BB (cepa Wistar)  |
| Hámster            | Hámster Chino, Hámster sudafricano   |
| Cuy                | En condiciones de laboratorio  |
| Primates           | Mono Macaca nigra  |
| Perro              | Keeshond dog   |
| Animales obesos    |  |
| Ratón              | Ratón ob/ob, C57BL/6j, ratón db/db C57BL/ksj, ratón japonés KK, ratón amarillo Ay, ratón Toronto KK, ratón amarillo KK, NZ |
| Rata               | Rata Zucker y rata BHE   |
| Hámster            | Hámster sirio  |

Tabla 9. Modelos de DM asociados y no asociados a obesidad (78)

- Efecto dietético y susceptibilidad genética:

|       |  |
|-------|--|
| Rata  | Rata Psammomys obesus (Sand)   |
| Ratón | Ratones espinosos o Spiny (Acomys cahirinus), ratones híbridos Wellesley |
| Mono  | Rhesus   |

Tabla 9. Modelos de DM experimental por susceptibilidad genética a la dieta (78)

El consumo de alimentos ricos en grasas saturadas o azúcares simples (sacarosa) puede acrecentar la concentración de insulina aumentando la deposición en tejido adiposo lo que reduce la sensibilidad a la insulina y favorece la intolerancia a la glucosa. La aparición de la diabetes evidente requiere de una susceptibilidad genética, como sucede en los monos Rhesus y el ratón Spiny (78).

## Modelos Inducidos

### *Inducción quirúrgica (82)*

En la segunda mitad del siglo XIX Oskar Minkowski y Josef von Mering permitieron aclarar las funciones del páncreas como glándula capaz de reducir los niveles de glucosa en sangre. En 1889, estos dos eminentes investigadores realizaron, sobre modelo canino, una pancreatectomía total. Después de la operación ambos investigadores observaron que el perro mostraba todos los síntomas de una diabetes severa, con poliuria, sed insaciable e hiperfagia. Minkowski observó además la presencia de hiperglucemia e intensa glucosuria.

De esta forma se demostró que el páncreas era necesario para regular los niveles de glucosa y se abrió el camino de las investigaciones para tratar de aislar de esa glándula mixta el principio activo que pudiera servir para el tratamiento de la diabetes.

La pancreatectomía parcial, con resección de más del 90% del páncreas, presenta una importante diferencia con la diabetes humana, pero a veces se puede comprobar una diabetes leve (de Sandmeyer) que puede ser transitoria. Ésta se puede agravar e incluso producir la muerte del animal si se alimenta con una dieta rica en glúcidos en la primera semana.

La pancreatectomía parcial en rata ocasiona una diabetes que tarda dos o tres meses en aparecer y se acelera por agentes diabetógenos, como demostraron los estudios de Mancini, Cardez y Foglia (1944).

En perros se produce una degeneración hidrópica de las células beta de la porción restante (Allen 1913) que se produce en los días inmediatos y tiene relación con la gravedad de la diabetes.

*Inducción hormonal*

Diabetes esteroidea, descrita por Ingle en 1941 en ratas sanas tras inyectar grandes dosis de hormonas corticoadrenales. Describió una resistencia insulínica, balance nitrogenado negativo, ausencia de glucosuria durante el ayuno, y reversibilidad de la diabetes al suspenderse la aplicación de esas hormonas. Conn (1948) reprodujo este modelo en humanos tras inyectar ACTH (82). Este diseño es especialmente útil como modelo de estudio de pacientes humanos trasplantados o en tratamiento esteroideo crónico (83).

Otras hormonas que pueden producir hiperglucemia en animales son la somatostatina, el glucagón, las catecolaminas y la tiroxina (69).

- Diabetes hipofisaria o metahipofisaria:

Houssay y Biasotti demostraron en 1930 que la extirpación de la hipófisis atenuaba la diabetes producida en perro y sapo, evidenciando que los extractos anterohipofisarios tenían acción antiinsulínica y que podían agravar la diabetes de perros pancreatoprivos o producir diabetes en perros normales. Young consiguió producir diabetes en perros normales usando dosis mayores de extractos anterohipofisarios, comprobando la hiperplasia de los islotes e hiperfunción en unos casos y atrofia y degeneración de los islotes en otros (82).

- Diabetes tiroidea y metatiroidea:

Los extractos tiroideos pueden producir diabetes tras reducir el páncreas a una séptima parte (Houssay 1946) por efecto tóxico sobre los islotes, y acción hiperglucemiante extrapancreática. La tiroidea es transitoria, la metatiroidea es irreversible (82).

*Inducción inmunológica*

Tras la inyección de insulina de cerdo o de buey en cobayas, estos producen un suero antiinsulínico, que produce una diabetes en ratas, como demostraron Moloney y Coval en 1955, reproducible sobre conejos y gatos, según la experiencia de Armin en 1960 (82).

*Inducción química*

Algunas sustancias químicas pueden generar insulino-deficiencia y cetosis. A dosis bajas pueden causar una reducción parcial de la masa de células beta (78).

Existen descritas diferencias entre machos y hembras en relación con la incidencia evolución y severidad del síndrome diabético, siendo en las ratas muy marcada a favor de los machos, debido en parte al papel protector del estradiol (84).

La principal ventaja de estos modelos es que el grado de alteración de las células beta puede ser regulado de acuerdo a la dosis de toxina administrada (69).

- Estreptozotocina:

La Estreptozotocina (STZ), 2-deoxi-2- (3- (metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos), es una sustancia producida por el *Streptomyces achromogenes* (85), presenta una acción bactericida, aunque en la actualidad es usada en humanos como antineoplásico (78) y que es capaz de producir de forma experimental tanto modelos de diabetes insulín-dependiente como insulín-independiente (85).

Su mecanismo de acción se basa en la alquilización del ADN, en particular sobre la posición O6 de la guanina, produciendo fragmentación del ADN, tras introducirse en la célula beta por medio del intercambiador GLUT2 (85).

La STZ produce una hiperglucemia con hiperinsulinemia a las dos horas de su inyección en el organismo. A las 6 horas se produce hipoglucemia con hiperinsulinemia, para finalmente producirse hiperglucemia con hiposinsulinemia. Se ha comprobado que este fármaco perjudica la oxidación de glucosa y disminuye la síntesis y secreción de insulina (86,87).

Las especies más sensibles a la estreptozotocina son algunos primates, el hámster, el perro, el cerdo, el ratón y el cuy (88–91). Dada su mayor acción citotóxica, capacidad de producir modelos de DM insulínica independiente y DM no insulínica independiente, y rangos de dosis diabetogénicas más amplias y seguros que los del aloxano, es preferido para los modelos inducidos químicamente, si bien su sensibilidad varía según la especie, línea, sexo, edad y estado nutricional (92).

- Aloxano:

El aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina;5,6-dioxiuracilo) presenta una acción diabétogena al provocar la necrosis de los islotes con desaparición de las células beta en diferentes especies, respetando las células alfa y delta (82). Su mecanismo de acción se basa en la lesión del ADN de las células beta a través de la formación de radicales libres, con gran afinidad por los grupos -SH, tras entrar en ellas a través del intercambiador GLUT2.

Trabajos experimentales han demostrado complicaciones similares a la que se producen en la diabetes humana: Schneider y Lewis en 1945 comprobaron hemorragias retinianas en conejos. Lazarow en 1952, produjo un estado diabético latente tras la inyección de dosis subdiabetogénicas en ratas. Loubatieres ha demostrado mejoramiento de la diabetes aloxánica parcial con drogas hipoglucemiantes (82).

No obstante el uso del aloxano presenta no pocos inconvenientes:

- Los animales más jóvenes tienen una alta resistencia al efecto diabetógeno del aloxano (93).
- Produce daño tubular que altera también los niveles de glucosa (94,95).
- La dosis tóxica y diabetogénica no solo varía entre especies sino también intraespecie (96).
- La dieta varía la acción del aloxano: en dietas ricas en glúcidos y proteínas tiene menos efecto, y más efecto en dietas ricas en grasas (97).
- En ratas y ratones se da una recuperación precoz tendiendo a la normo glucemia. Esto se debe a la multiplicación de las células beta desde el epitelio del ducto o de la porción exocrina (98,99).
- Las dosis escasas de aloxano (<140mg/Kg en inyección peritoneal) se relacionan con la recuperación espontánea de niveles de normo glucemia tras un periodo diabético (95).
- La producción de diabetes depende de la velocidad a la que se inyecte el aloxano (100).
- El tejido humano es resistente al uso del aloxano, por lo que difiere de la fisiopatología humana (95,101).



### *Manipulación genética*

- Espontánea experimental:

Los cruzamientos sucesivos entre animales diabéticos consanguíneos obtienen líneas diabéticas como demostraron Meier y Yerganian en 1961 (82).

- Técnicas de manipulación genética:

- Sobreexpresión (ratones transgénicos).

Incorporación de un gen modificado en el pronúcleo de un oocito fertilizado, y posterior implantación en madre adoptiva. Se incorpora de forma aleatoria en el genoma y sólo una pequeña proporción de oocitos fertilizados darán lugar a una primera generación que expresa el gen de interés.

- Eliminación (knock-out) o reemplazo (knock-in).

Mediante técnicas de manipulación genética se elimina, altera o sustituye el gen correspondiente en células troncales embrionarias, las cuales se inyectan en un embrión precoz en el cual se integran dando lugar a animales quiméricos (69).

#### **1.4.2 Técnica quirúrgica de isquemia**

Al querer reproducir en un modelo murino experimental una isquemia de un miembro en un modelo roedor, por regla general se utiliza la extremidad posterior izquierda, por ser más accesible su arteria iliaca común.

En los estudios de validación de pruebas de imagen, una ligadura aislada de arteria femoral puede ser suficiente (102), mientras que en los estudios de

isquemia de miembro posterior, suelen ser necesarios procedimientos más agresivos para obtener estadios clínicamente relevantes.

Los estudios de isquemia-angiogénesis suelen precisar intervenciones a varios niveles, siendo lo más común la ligadura de arteria iliaca común o la ligadura y sección de arteria iliaca común, de arteria femoral y de sus ramas colaterales (103–106), aunque también hay quienes usan el modelo de Rochester, con tratamiento exclusivo a nivel iliaco, con doble ligadura y punto de transfixión entre ambas ligaduras (107). De relevancia es el estudio realizado por Tang, que comparaba un modelo de isquemia aguda con ligadura de iliaca común y femoral, con otro de isquemia crónica en el que a parte de la ligadura iliaca, se introducía un constrictor en arteria femoral para controlar el grado de estenosis a producir (106).

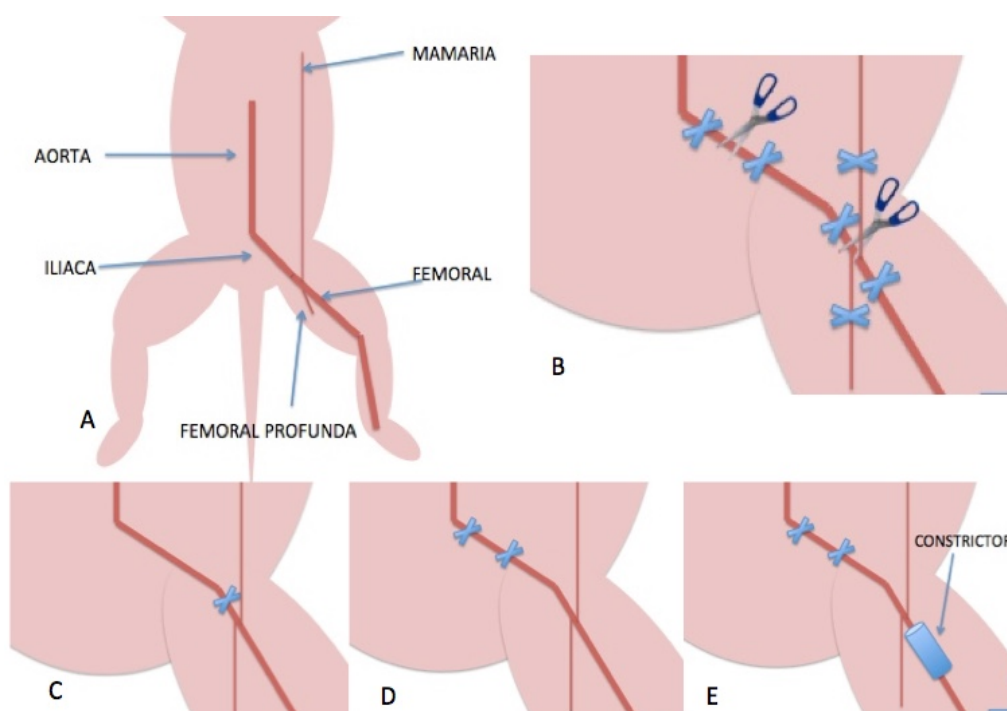


Figura 4. Diferentes técnicas de isquemia experimental de la extremidad posterior en modelo murino. A. Esquema general de la vascularización de extremidad posterior en las ratas con dos ejes uno profundo (aortoiliaco) y otro superficial y muy desarrollado (mamario). B. Esquema del modelo utilizado por en este trabajo. C. Esquema del modelo utilizado para la validación de pruebas de imagen. D. Esquema del modelo de Rochester de isquemia. E. Esquema del modelo de Tang de isquemia crónica.

\* X identifican ligaduras y tijeras zonas de corte.

### 1.4.3 Técnicas de angiogénesis

#### Células madre

##### Células troncales derivadas de tejido hematopoyético

Las células derivadas de médula ósea han demostrado buenos resultados como inductoras de la neovascularización, aumentando la perfusión de los miembros isquémicos. También se han utilizado para las complicaciones secundarias a la diabetes, como la polineuropatía (107,108).

##### Células troncales derivadas de membrana fetal

En 2008 Shin Ishikane demostró que se podían utilizar células derivadas de las membranas fetales en ratas sin presentar rechazo inmunológico y con resultados similares a los obtenidos con células derivadas de tejido hematopoyético, presentándose como una alternativa menos agresiva a éstos (103).

##### Células troncales derivadas de tejido mesenquimal

Las células mesenquimales han demostrado en diferentes modelos animales ser capaces de mejorar las complicaciones derivadas de la diabetes, como la neuropatía, cardiomiopatía, nefropatía y úlceras diabéticas no isquémicas (109). Iwase demostró que el efecto angiogénico de las células derivadas de tejido mesenquimal era superior a las derivadas de células mononucleares y que además tenían mayor supervivencia en tejidos isquémicos. Así mismo también se evidenció que las células se diferenciaban en células endoteliales y de músculo liso (104).

El mecanismo por el cuál las células mesenquimales actúan sobre la regeneración vascular se basa en sus efectos paracrin, así como en su capacidad para diferenciarse en células musculares lisas vasculares y células endoteliales (110).

Estas células, en condiciones de isquemia, regulan la inflamación al liberar gran cantidad de VEGF, bFGF, HGF, angiopoyetina 1, IGF-1 MCP-1 y SDF-1, que actúan de forma angiogénica, antiapoptótica e inmunomoduladora (110,111).

La capacidad para la diferenciación en células musculares lisas y endoteliales siguen diferentes vías que se resumen en las siguientes figuras.

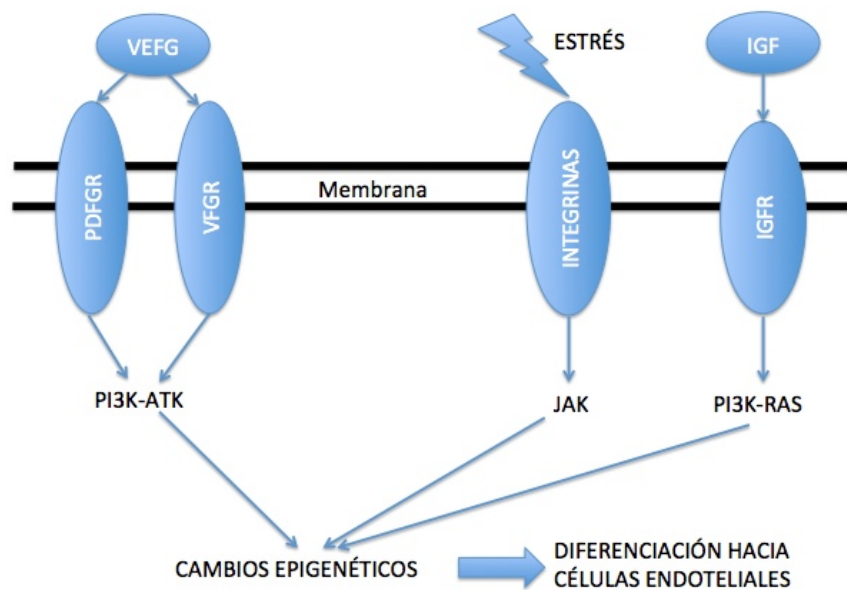


Figura 5. Diferenciación de células mesenquimales hacia células endoteliales. Modificado de “Mesenchymal stem cells and vascular regeneration” (110). VEGF, activa los receptores PDFGR y VFGR, IGF, se une a IGFR y los estímulos mecánicos activan integrinas, produciendo cambios epigenéticos a través de varias vías de señalización. .

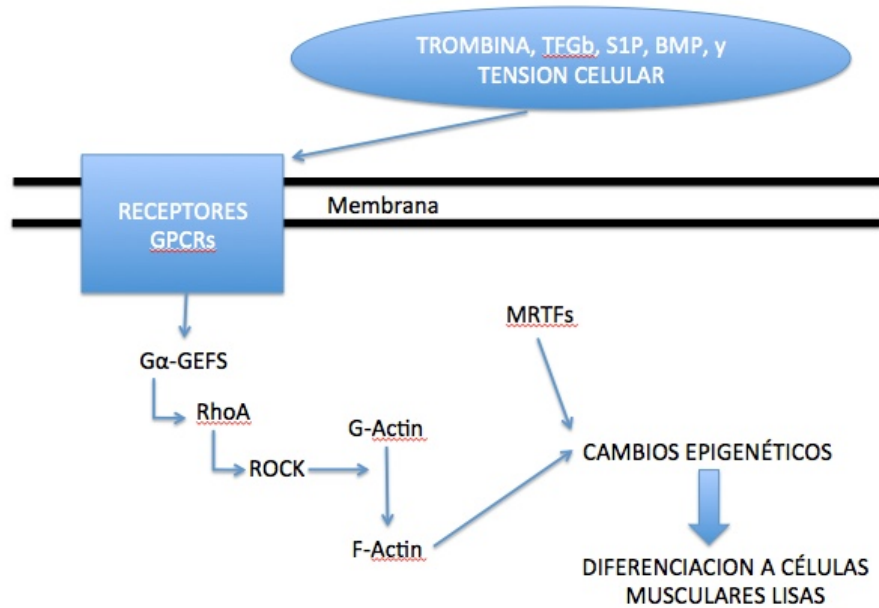


Figura 6. Diferenciación de células mesenquimales a células musculares lisas. Modificado de “Mesenchymal stem cells and vascular regeneration” (110). La trombina, TGF, S1P, y BMP (proteínas de morfología ósea) activan el GPCR que inicia la cascada RhoA-ROCK, que termina con la polimerización de G-actina. Los factores de transcripción relacionado con la miocardina (MRTFs) junto con la G-actina, se traslocan al núcleo, y activan la expresión de genes de células musculares lisas mediante la unión de los elementos SRF-CArG.

### Dalteparina

Se ha evidenciado que la unión entre heparina y Factor de Crecimiento Endotelial A (EGF-A), es un factor clave en la angiogénesis en situaciones de hipoxia, curación de úlceras, inflamación y crecimiento vascular (112), del mismo modo que los principales mediadores implicados en la angiogénesis se unen a heparinas y dependen del heparan sulfato (113).

En el estudio de Norrby de 2009, se comprobó el efecto proangiogénico de la dalteparina, aunque éste se llevó a cabo sobre mesenterio con ratas Sprague-Dawley (114).

Otro estudio de 2012 usó conejos con isquemia inducida quirúrgicamente, a los cuales se les instilaron micropartículas de fragmina/protamina que contenían factor de crecimiento de fibroblastos 2, obteniendo buenos resultados e insinuando que podría ser un tratamiento apto para humanos (115).

### Terapia génica recombinante

Rong Fang Lan y cols, usaron ADN recombinante para expresión de la proteína de membrana CD151, unido a un vector vírico, con la hipótesis de aumentar la angiogénesis en ratas Wistar, a las que se había extirpado la arteria femoral. Se hizo seguimiento con termografía, angiografía, histología e inmunohistoquímica, obteniendo buenos resultados sobre la arteriogénesis (116).

### Campos electromagnéticos

La terapia con pulsos electromagnéticos se ha usado para el tratamiento de enfermedades crónicas, principalmente osteoarticulares, desde hace mucho tiempo (117–119).

Los efectos principales que tienen estos campos electromagnéticos sobre el organismo son la vasodilatación y el aumento de temperatura (120), aunque también aumenta la producción de factores de crecimiento de fibroblastos que estimulan la angiogénesis (121) y la curación de úlceras en ratas (122).

En 2012, el artículo de Yunhun Pan, demostró los efectos angiogénicos de los campos electromagnéticos que se producen sobre ratas diabéticas. En este protocolo se usaron ratas Sprague Dawley, con inducción diabética con estreptozotocina e isquemia con sección y ligadura de la arteria femoral y cauterización eléctrica de ramas femorales. El tratamiento se realizó con campos electromagnéticos asimétricos con pulsos de 4,5ms a 15 Hz con un flujo de densidad magnético de 0 a 1,2 mT en 200 microsegundos, a los 7, 14 y 28 días.

El seguimiento se hizo con Laser-Doppler y estudios histológicos, demostrando mejoría de la perfusión y angiogénesis (123).

#### 1.4.4. Variables a considerar en la isquemia y angiogénesis

La isquemia y la angiogénesis se pueden evaluar clínicamente, con técnicas de imagen, variables hemodinámicas y estudios histopatológicos.

##### Variables Clínicas (105,106)

Una de las escalas clínicas más utilizada es la clasificación ordinal en función del aspecto de la extremidad y de la presencia o no de cojera según se expone en la tabla 11.

|   |                      |            |
|---|----------------------|------------|
| 0 | Normalidad           |            |
| 1 | Palidez              | +/- cojera |
| 2 | Lesiones por presión |            |
| 3 | Necrosis             |            |

Tabla 11. Escala ordinal de clínica secundaria a la isquemia.

En los estudios que utilizaron estos controles vieron que la mayoría de las ratas presentaban lesiones por presión a los 10 días (106), con evolución de las mismas hacia la curación o a la pérdida de la extremidad en los 40 días siguientes del tratamiento (105).

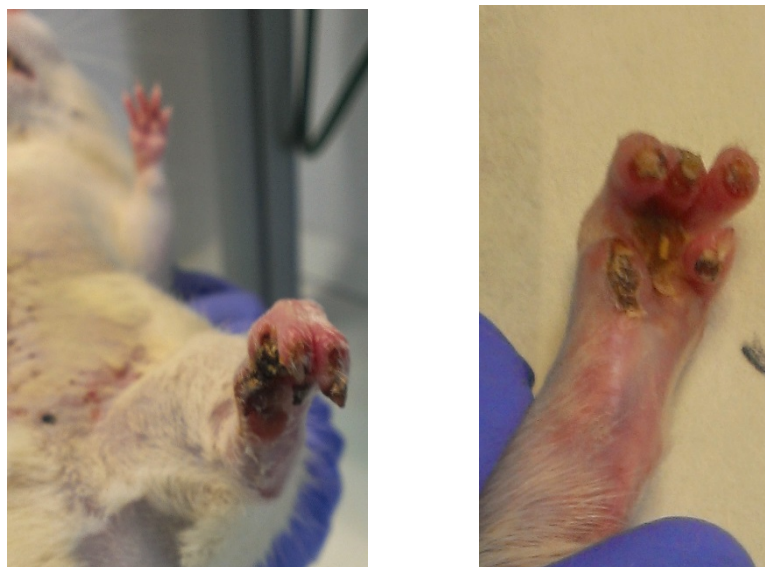


Figura 7. Fotografías de lesiones necróticas, contractura y auto-amputación digital secundarias a la isquemia.

### Técnicas de imagen

La Angio-resonancia magnética está ampliamente validada en estudios oncológicos para la valoración de neoformaciones y neovasos (102,124–126). Estos estudios se basan en las estimaciones de lavado o movimiento de agua endógena, siendo de baja sensibilidad aunque no invasivos. El uso de agentes paramagnéticos exógenos ha demostrado aumentar la sensibilidad (127).

Otra opción es la arteriografía post-sacrificio, que precisa la retirada de piel e inyección trans-aórtica de contraste heparinizado con toma de imágenes (106,107,116,128,129).

Tanto en la RNM como en la arteriografía el recuento de nuevos vasos se realiza con angioscore o recuento de nuevos vasos por cuadrícula (106,128,129), aunque en RNM también se puede medir el índice de perfusión muscular en regiones de interés (127).



Variables hemodinámicasLáser Doppler.

Tang realizó medición con Láser Doppler de pezuña y gemelo, con control del oxígeno inhalado (1l/min) y de la hipotermia. La comparación con el control mostró los niveles más bajos tras la cirugía aumentado a un 60% a las dos semanas y un 66% a los 40 días (103,104,106).

Tensión de oxígeno trans-cutánea (105,106,130).

Con el uso de un sistema de probetas medidoras de oxígeno y temperatura se realizaron mediciones en gastrocnemio en los días 3, 14 y 40 objetivando que las oclusiones crónicas tenían menor tensión de oxígeno que las agudas, habiéndose recuperado en el día 40 las agudas (106).

También se demostró que independientemente de la concentración de oxígeno (ambiental o concentración del 100%) se obtenían presiones parciales menores en la extremidad isquémica que en la control, sin ser estadísticamente significativas las diferencias a partir del día 24 (105,130).

Termografía con cámara de infrarrojos (116,131).

En estos estudios se realizaba la comparación entre extremidades rasuradas de temperatura y flujometría por ultrasonido sobre la arteria tibial posterior, obteniendo diferencias estadísticamente significativas en temperatura y flujometría.

Flujometría (107,116,131).

Con sistema Transonic T106 (Ithaca, NY) se midió el flujo en arteria femoral tras una hora de estabilización-calibración de la señal y comparación con extremidad control obteniendo mejorías estadísticamente significativas tras la implantación de células estromales derivadas de médula ósea.

Variables morfológicasControl del peso de extremidad (105).

El peso de las extremidades fue comparado para determinar la atrofia post-isquemia. En los sacrificios obtenidos en los tres primeros días se comprobó aumento del peso por edema e inflamación, aunque en los animales sacrificados en días 10, 24 y 40 se comprobó la atrofia con peso menor en las extremidades isquémicas.

Análisis histopatológico con programas fotográficos.

Tras la sección, fijación y tinción con hematoxilina-eosina se realizan fotografías digitales con el microscopio. Estas imágenes se procesan con un programa de dominio público y disponible en internet ImageJ® (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>), del National Institute of Health de Estados Unidos, que calcula el área de músculo viable (células eosinófilas, empaquetadas de forma compacta, homogéneas, con núcleos periféricos), la inflamación (infiltración celular de linfocitos, neutrófilos y monocitos) o la necrosis (fibras musculares hipereosinófilas sin núcleo) (105).

Otra opción es usar el programa Fovea Pro (Reindeer Graphics, Inc, Asheville, NC) para analizar tamaño de los vasos en las imágenes

digitales de arteriografías y las áreas de necrosis de las secciones musculares (106).

#### Densidad capilar

En estudios donde se realizó sacrificio a las 3 semanas se obtuvieron cuatro piezas del músculo aductor y del semimembranoso. Tras fijar las muestras con formaldehído o nitrógeno líquido se tiñeron con indoxilterazolio para detectar las células endoteliales. Se seleccionaron de forma aleatorizada cinco campos por pieza y se hizo recuento posterior, con ajuste del mismo por número de fibras musculares para evitar la sobre o infraestimación por edema intersticial o atrofia (103,104,132).

Otra estrategia es la que realizó Abdoulaziz, quién marcó las arteriolas (identificadas por la presencia de células musculares lisas de su pared) con anticuerpo para factor VIII en 10 campos a 400x, calculando la media de dichos campos (107).

#### Estudios de supervivencia y localización celular.

En el estudio de Ishikane, se objetivó la supervivencia de las células trasplantadas y la alo-reactividad de Linfocitos T, mediante antiDFP de conejo o anti-ratCD3 de ratón (103).

Por su parte Lan, que investigaba el efecto angiogénico del gen codificador de CD151, inyectado en el organismo junto con un adenovirus vector, identificó las células infectadas con anticuerpo antiCD151 (116).

### **1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

La Diabetes Mellitus es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de arteriosclerosis (133), que es la principal causa de muerte en los pacientes diabéticos, provocando hasta 50% de las muertes entre ellos (134).

La afectación de las arterias de las extremidades inferiores, así como la enfermedad coronaria o la cerebrovascular, son diferentes manifestaciones de la arteriosclerosis sistémica. La arteriopatía periférica o isquemia arterial crónica, afecta al 4,3% de la población, alcanzando cifras dentro del subgrupo diabético de hasta el 7,5% entre los 60 y 64 años (1,11,135).

El tratamiento actual de esta entidad es la revascularización, ya sea a través de cirugía “abierta”: *bypass*, plastias y endarterectomías, o procedimientos endovasculares: angioplastias y *stenting*. No obstante, estos tratamientos no siempre pueden llevarse a cabo por las características anatómicas de las lesiones o fracasan en su propósito de llevar más sangre al territorio isquémico, por lo que, en ocasiones, como última opción, se debe realizar una amputación que conlleva una agresión grave al paciente con una alta morbilidad postoperatoria, un deterioro severo de la calidad de vida y un alto gasto sanitario (136–138).

En este contexto, la angiogénesis terapéutica tiene como objetivo estimular la proliferación de los vasos colaterales. Se han descrito numerosas moléculas angiogénicas, tanto en modelos animales como en humanos en situaciones de isquemia (139–143). También se ha postulado el uso de diferentes células troncales como las derivadas de tejido hematopoyético, de membrana fetal y de tejido mesenquimal (103,104,108,144,145).

Las estrategias que no implican la implantación celular presentan grandes

problemas, como son la escasa supervivencia que tienen moléculas dentro del organismo y las complicaciones posibles de la terapia genética con uso de vectores víricos (110).

Entre las células mesenquimales, las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASCs) son unas interesantes candidatas ya que se pueden obtener de forma poco agresiva, presentan un perfil inmunológico privilegiado, son multipotentes y han mostrado seguridad en el uso tanto autólogo como alogénico, en ensayos experimentales y en ensayos clínicos en Fases I y IIa, para el tratamiento de enfermedades isquémicas, gracias a su fácil y rápida proliferación y diferenciación hacia diferentes tipos celulares (146). Las ASCs también secretan factores angiogénicos, inmunomoduladores y de supervivencia celular por lo que han demostrado ser efectivas para el tratamiento de la arteriosclerosis y de las complicaciones de la diabetes en modelos animales y en humanos (35,104,108,145,147).

Resulta llamativo que siendo la diabetes uno de los principales factores de riesgo de la arteriosclerosis haya pocas publicaciones sobre el tratamiento con células mesenquimales en la isquemia de diabéticos.

Tras una búsqueda sistemática en pubmed sólo encontramos 7 artículos que abarquen los conceptos de diabetes, isquemia y células estromales mesenquimales:

- (((("Diabetes Mellitus"[Mesh] OR "Diabetes Complications" [Mesh])) OR "Diabetes Mellitus, Experimental" [Mesh]) AND "Ischemia" [Mesh]) AND "Mesenchymal Stromal Cells" [Majr]

De éstos, 5 están dirigidos a la búsqueda de factores que mejoren la función de las células mesenquimales en isquemia (148–152) y 2 ponen de relieve

la ineficacia de las células mesenquimales obtenidas de ratas diabéticas para la angiogénesis terapéutica (153,154). Todos estos estudios se han realizado con una estrategia de trasplante autólogo, de la misma forma que los 93 ensayos registrados en *clinicaltrial.gov*, que estudian la angiogénesis terapéutica con células mesenquimales (entre ellos 14 con ASCs).

El trasplante de células mesenquimales autólogas plantea varios inconvenientes relevantes:

- Las células mesenquimales derivadas de sujetos con enfermedad cardiovascular y/o diabetes son menos efectivas (153,155–158).
- Es preciso intervenir a un sujeto con una enfermedad crítica para obtener sus células mesenquimales, y es necesario que este sujeto espere el tiempo de maduración y diferenciación celular.

Una estrategia alogénica permitiría la creación de depósitos de células “estándar”, lo más efectivas posible ante la isquemia, evitando procedimientos sobre sujetos enfermos y acortando los tiempos para la implantación.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

- Hipótesis principal: Las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo de especímenes no diabéticos implantadas en modelo murino diabético de isquemia crítica, produce mejoría en la perfusión distal de la extremidad.
- Hipótesis nula: No existen mejoras en la perfusión distal por el efecto angiogénico producido por las células mesenquimales no diabéticas sobre en un espécimen diabético.



## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1 Primera fase:**

- Puesta a punto, comprobación y estandarización de modelo de diabetes y de modelo de isquemia.
- Descripción de los efectos de la glucemia inducida sobre los especímenes.
- Comprobación y documentación de la evolución de la isquemia en modelos diabéticos.

### **2.2.2 Segunda fase:**

#### Objetivos principales:

- Comparar el estado isquémico percibido de las ratas diabéticas con isquemia experimental, con y sin células mesenquimales.
- Comparar la evolución de las lesiones tróficas en ratas diabéticas con isquemia experimental, con y sin células mesenquimales.
- Comparar la angiogénesis en ratas diabéticas con isquemia experimental, con y sin células mesenquimales.

#### Objetivos secundarios:

- Comparar la mortalidad-supervivencia de las ratas diabéticas con isquemia experimental, con y sin células mesenquimales.
- Comparar el estado general e isquémico percibido de las ratas diabéticas con isquemia experimental, con y sin células mesenquimales.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental se realizó en el Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz y el estudio histopatológico de las muestras en el Área de Histología Humana y Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid.

Se siguió el protocolo aprobado por el CEBA (Comité Ético de Bienestar Animal) del Hospital Universitario La Paz con número CEBA 02-2014 y teniendo en cuenta las normas de la Directiva Comunitaria sobre animales de experimentación (86/609/CEE) así como la normativa española (RD 1201/2005).

#### ***3.1 PUESTA A PUNTO DEL MODELO EXPERIMENTAL***

El modelo de cirugía isquemizante y el de inducción diabética precisan de una estandarización y puesta a punto en nuestro medio debido a la variabilidad anatómica de los especímenes intraespecie, a las distintas formas de producir isquemia y a la variabilidad de la tasa de efectividad/mortalidad que suponen tanto la cirugía como los químicos diabetógenos.

Para su homogenización se desarrolló un proceso de “puesta a punto” mediante experimentos progresivos con el objetivo de realizar un modelo reproducible, que minimizara las variaciones que pudieran deberse a la curva de aprendizaje quirúrgico, y a optimizar la dosis de fármaco inductor para la especie animal y peso.

### **3.1.1. 1º Experiencia: Modelo de isquemia.**

Se intervinieron 5 ratas Sprague-Dawley macho con peso entre 250 y 300 gramos.

El procedimiento se realizó, tras el rasurado de abdomen e ingle, la aplicación de povidona yodada al 10% y bajo anestesia general con isoflorano al 4% para la inducción y al 2% para el mantenimiento.

En dos casos, a través de incisión transversa a nivel inguinal, se ligó y seccionó la arteria femoral y ramas dependientes de la misma.

En tres especímenes se realizó incisión xifopubiana e inguinal transversa para la ligadura y sección de la arteria femoral, la arteria iliaca común izquierda y de las ramas correspondientes.

Se realizó seguimiento cada 24 horas durante 3 días, aplicando tramadol vía subcutánea a 20mg/kg/24horas, como analgesia.

En esta experiencia se observó la aparición o no de lesiones tróficas, de amputaciones, de cojera y de cianosis y se recogió la opinión experta del personal del animalario sobre el estado general de los animales.

El sacrificio se realizó a los 3 días mediante inyección intracardiaca de cloruro potásico bajo anestesia general con isofluorano.

### 3.1.2 2º Experiencia: Modelo de diabetes y modelo de isquemia

#### Inducción diabética

En esta experiencia se trataron 6 ratas macho Sprague Dawley, con pesos entre 220-250, albergadas en dos jaulas y en condiciones óptimas de temperatura ( $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $55\% \pm 5\%$ ) y luz (ciclos de 12 horas de luz, de 8:00 a 20:00), con acceso libre a agua y alimento.

Tras el peso de los especímenes se procedió a la preparación de la disolución de estreptozotocina a inyectar. La preparación de la estreptozotocina se realizó en solución tampón 50mM de citrato de sódico (pH4,5), disolviendo la estreptozotocina en 1ml de solución tampón con una concentración final de 10mg/ml. La inyección intraperitoneal de la estreptozotocina con una dosis de 0,65mg/Kg, con una jeringa de 3 ml y aguja de 23 Gauge. Este tipo de disolución debe inyectarse de inmediato tras la preparación de la misma.

Tras la inyección se volvieron a albergar a los animales en las jaulas con alimentación libre y agua azucarada al 10%, el mismo día del procedimiento. Al segundo día se reintrodujo el agua no azucarada. El décimo día, en ayunas, y el undécimo, sin ayunas, se realizó test de glucosa con una gota de sangre venosa obtenida mediante venoclisís en la cola.

Para el diagnóstico de diabetes se consideró como punto de corte una glucemia superior a 150 mg/dl en ayunas, o a 200mg/dl sin ayuno.

### Modelo de isquemia

Tras el rasurado de abdomen e ingle izquierda, aplicación de solución yodada al 10% y bajo anestesia general con isoflorano al 4% para la inducción y al 2% para el mantenimiento, se realizó incisión xifopubiana e inguinal transversa para la ligadura y sección de la arteria femoral, la arteria iliaca común izquierda y ramas correspondientes.

Se realizó analgesia postquirúrgica y a las 24 horas con tramadol (20mg/kg) de forma reglada y posteriormente en función de la evolución y estado del animal.

El seguimiento se hizo con valoración de los siguientes ítems

#### -Isquemia

Cianosis

Lesiones de decúbito-ulceración

Contractura de la pata

Cojera

#### -Estado General

Pelaje amarillento

Abdomen hinchado

Resto de secreciones en hocico

Pliegue cutáneo-deshidratación

El sacrificio se realizó al décimo día, con inyección intracardiaca bajo anestesia general de cloruro potásico, se realizó desarticulación de ambas extremidades posteriores y separación de la piel para pesado por separado y poder comparar los pesos de las extremidades.

### **3.1.3 3° Experiencia: Modificación del modelo de diabetes**

Se trataron 5 ratas Sprague Dawley macho con pesos entre 350 y 370 gramos, siguiendo el modelo anteriormente descrito, pero con las siguientes modificaciones:

- Inducción diabética con dosis de estreptozotocina de 70mg/kg.
- Cambio de la hoja de seguimiento y establecimiento de un punto de corte para revisión de medicación y condiciones para punto final: estado comatoso, deshidratación importante y pérdida de peso de >20% mantenida 3 días.

### 3.2. DESARROLLO DEL ESTUDIO

#### 3.2.1 Protocolo de selección, cultivo y diferenciación de células pluripotenciales

##### Selección y cultivo

- Bajo anestesia general se extrajeron células adiposas de la pared abdominal de una rata Sprague Dawley macho de 16 semanas de edad y 356 gramos de peso (Figura 8).

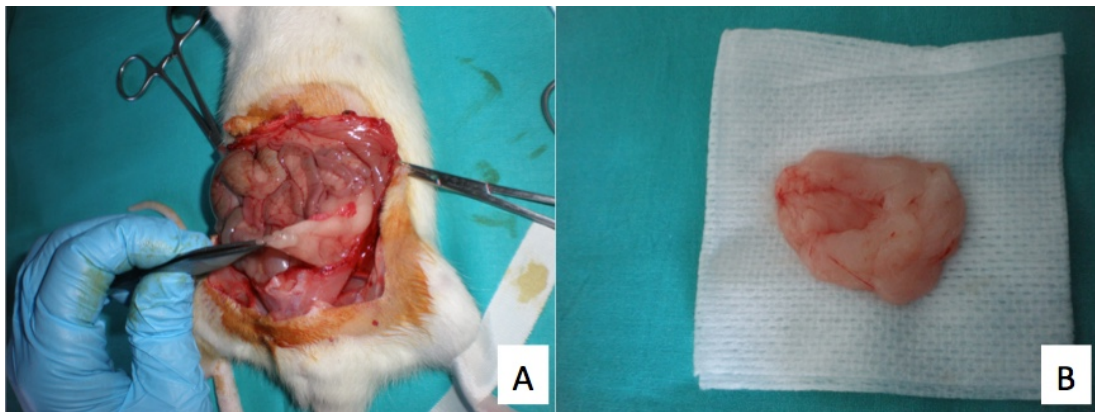


Figura 8. A. Obtención quirúrgica de grasa de pared abdominal. B. Pieza de tejido adiposo obtenido.

- Se introdujeron las botellas estériles con la muestra de grasa en una cabina de flujo laminar.
- Mediante corte con tijeras y/o bisturí se disgregó la grasa que fue depositada sobre un tubo con PBS (Tampón salino fosfato).
- Estos tubos, con la muestra de tejido graso en su interior, fueron centrifugados a 300G durante 5 minutos a temperatura ambiente. Todas las centrifugaciones posteriores se realizarán en las mismas condiciones.
- Se eliminó la fracción soluble (inferior) mediante aspirado con pipeta, depositando dicha fracción en un recipiente para su posterior eliminación como residuo biosanitario.



- Se añadió PBS hasta un volumen total de 50 ml/tubo y se volvió a centrifugar.
- En cada tubo se añadió 1/5 volumen de la solución 6X de Colagenasa I de Sigma (concentración final 0,075%) previamente activada, y se homogeneizó mezclando suavemente por inversión.
- Durante 30 minutos se incubó a 37°C con agitación suave.
- A continuación se inactivaron las enzimas añadiendo el mismo volumen de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), como medio de cultivo + 10% FBS (Suero Fetal Bovino) que de colagenasa y mezclando suavemente por inversión.
- Se centrifugó de nuevo y se retiró con pipeta la fracción superior dejando únicamente el agregado celular.
- El agregado celular se lavó con PBS (50 ml/tubo), para posteriormente centrifugar y eliminar el sobrenadante.
- Se realizó resuspensión en cada tubo con 10 ml de la solución de lisis de eritrocitos (0,16M de Cloruro amónico).
- Durante 10 minutos se incubó a temperatura ambiente con agitación suave.
- A la solución anterior se añadió PBS a cada tubo hasta un volumen final de 50 ml.
- Se realizó centrifugación y eliminación del sobrenadante.
- Se resuspendió el agregado celular de cada tubo en 5 ml de PBS y se reunieron las células procedentes de los tubos procesados en un único tubo.
- Mediante un filtro de nylon de 70  $\mu$ m, se filtraron las células sobre nuevos tubos de 50 ml, y se realizó un lavado del filtro con 25ml por tubo de PBS. Conforme los filtros se obstruyeron se cambiaron por otros.

- Cada tubo fue centrifugado, eliminando posteriormente el sobrenadante y se realizó resuspensión del agregado celular con 5 ml de PBS.
- Se juntó toda la suspensión celular obtenida en un único tubo de 50 ml y se centrifugó, eliminando posteriormente el sobrenadante.
- Se resuspendió el agregado celular en 10 ml de Medio de cultivo completo (DMEM +1 0%FBS + 1% Penicilina/estreptomicina).
- Se separó 100 $\mu$ l para contar las células viables tiñéndolas con azul tripán y visualizándolas al microscopio sobre una cámara de Neubauer.
- El resto de las células se sembraron sobre tubos estériles de 75 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en una densidad de 30.000 células por cm<sup>2</sup>.
- A las 48 horas se lavó la placa de cultivo con PBS y se añadió nuevo medio de cultivo completo manteniendo la incubación de las células adherentes, a las cuales se les cambió el medio de cultivo cada 3-4 días para “refrescar” los nutrientes necesarios.
- Cuando se alcanzó el 80% de confluencia, las células se despegaron de la placa de cultivo con tripsina/EDTA. Tras neutralizar la tripsina con medio de cultivo, se centrifugó a 300G durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Por último se realizó una expansión celular, un recuento de las células obtenidas y se subcultivaron a razón de 30.000-50.000 células/cm<sup>2</sup> para expandir hasta obtener el número necesario. Una vez obtenido el número de células necesarias para todos los ensayos se criopreservaron en una solución de 10% de dimetilsulfóxido en suero fetal bovino y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su futura utilización (se ha demostrado que pueden criopreservarse de forma indefinida manteniendo su viabilidad y propiedades biológicas).

- Parte de las células se reservaron para caracterizarlas y para diferenciarlas, demostrando así que son células mesenquimales según los criterios internacionales.
- Antes de utilizar las células, se descongelaron y cultivaron según lo expuesto anteriormente durante 10 días, de tal manera que todas las células se hubieran duplicado y se comprobara que la congelación no había afectado sus características.

### Caracterización de ASCs

El análisis de la expresión de antígenos de membrana de las ASCs se llevó a cabo en un citómetro láser de argón FACScan (Becton/Dickinson Biosciences; BDB, San José, CA, EEUU). Para ello, aproximadamente  $1 \times 10^5$  células en suspensión en PBS se incubaron 20 minutos a 4°C en oscuridad con los siguientes anticuerpos monoclonales de AbD Serotec conjugados con fluorocromos CD45- (FITC), CD90+ (APC), CD34- (PE), CD 105+ (FITC), CD29+ (PE) y HLA DR- (PE). Se adquirieron, al menos,  $1 \times 10^4$  eventos por tubo utilizando como soporte informático el programa CELLQuest Pro (BDB). La población celular se consideró positiva para un marcador determinado cuando su media de la intensidad de fluorescencia (IMF) expresada en unidades lineales y arbitrarias en una escala de 0 a 1023, era mayor que la IMF más dos veces la desviación estándar de la autofluorescencia obtenida para la misma población celular.

Se caracterizaron las células antes de ser congeladas y tras su descongelación; de esta manera comprobamos que la congelación no había alterado sus características.

### Marcaje de las ASCs

Para poder realizar fácilmente el seguimiento de las células durante la primera fase una vez inoculadas, las sometimos a una tinción fluorescente transitoria con DiI acorde al protocolo de la casa comercial (Invitrogen®), previo al implante celular.

### Diferenciación de las ASC

#### Diferenciación adipogénica:

- Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo y se mantuvieron en cultivo renovando el medio cada 3-4 días hasta llegar a confluencia (Figura 9).
- Tras varios días confluentes se indujo su diferenciación a adipocitos.
- Durante 14 días se introdujo en medio de cultivo adipogénico renovándolo cada 2 días. El medio de cultivo adipogénico (medio de inducción) se componía de: DMEM-10 suplementado con isobutil-metilxantina 0,5 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), dexametasona 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), insulina 10  $\mu$ M (Actrapid®, NovoNordisk A/S, Bagsværd, Dinamarca) e indometacina 200  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU).

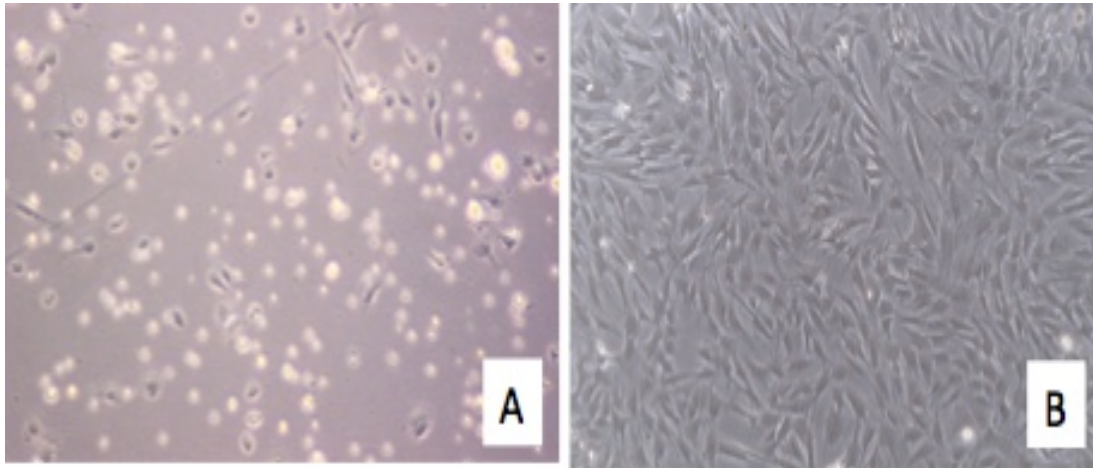


Figura 9. A. ASC tras 1 hora de siembra. B. ASC confluentes y adheridas a plástico tras 4 días.

- Posteriormente las células se cultivaron durante 4 días más con DMEM-10 suplementado sólo con insulina 10  $\mu$ M (medio de mantenimiento).
- Los controles negativos fueron ASCs cultivadas sólo con DMEM-10 durante el mismo periodo de tiempo.
- Tras fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente, la acumulación de lípidos se visualizó mediante la tinción con Oil Red O (ORO) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) al 0,3% en isopropanol 60% durante 30 minutos en agitación suave. El exceso de colorante se eliminó mediante varios lavados con PBS.
- A continuación se extrajo el ORO de las células añadiendo isopropanol y se midió la absorbancia a 510 nm en el lector de placas.

Diferenciación osteogénica:

- Bajo las mismas condiciones de siembra que en el apartado anterior, las células confluentes fueron inducidas a diferenciarse a osteocitos mediante la incubación con medio osteogénico durante 28 días, renovando el 60% del volumen cada 3-4 días. La composición del medio fue la siguiente: DMEM-10 suplementado con dexametasona 0,01  $\mu$ M, ascorbato-2-fosfato 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU), y  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU).
- El control negativo de diferenciación consistió en cultivar las células con DMEM-10 durante 28 días.
- Tras el periodo de incubación las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Los depósitos ricos en calcio secretados por los osteocitos a la matriz extracelular se visualizaron mediante la tinción de Rojo de Alizarina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU).
- Las células fijadas se incubaron con Rojo de Alizarina al 1% en agua destilada a pH 4,1 durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, con agitación suave.
- A continuación, el exceso de colorante se eliminó tras varios lavados con agua destilada.
- La cuantificación del colorante depositado se llevó a cabo mediante su extracción con cloruro de cetilpiridinio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) al 10% (p/v) en fosfato sódico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EEUU) 10 mM a pH 7 y midiendo la absorbancia de los extractos diluidos 1/10 en el lector de placas a 540 nm.

### 3.2.2 Selección de la muestra

Se utilizaron ratas macho de raza Sprague Dawley con pesos comprendidos entre 150 y 250 gramos, que se encontraban albergadas en jaulas en un número máximo de 5, y en condiciones estandarizadas de temperatura ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), humedad ( $55\pm 5\%$ ), ciclos de luz de 12 horas (de 8:00 a 20:00 horas), con acceso libre a agua y alimento, *ad libitum*.

#### Grupo A: seguimiento a largo plazo

En el grupo de seguimiento a largo plazo se realizó inducción diabética en 14 ratas Sprague Dawley macho con pesos entre 180 y 250 gramos.

A las ratas supervivientes y diabéticas se realizó cirugía isquémica con inyección de células pluripotenciales en todos los casos, y seguimiento cada 48 horas hasta los 30 días, momento en el que fueron sacrificadas.

#### Grupo B: seguimiento a corto plazo

En el grupo de seguimiento a corto plazo se realizó inducción diabética en 40 ratas, con pesos entre 180 y 250 gramos.

A las ratas supervivientes y diabéticas se realizó cirugía isquemizante, con inyección de células pluripotenciales, con un rango casos:controles de 3:2.

La forma de aleatorizar los casos y controles fue siguiendo el orden que se estableció previo a la inducción diabética, de forma que, en el supuesto de que todas las ratas hubieran sobrevivido, las ratas 1, 2 y 3 recibirían el tratamiento con células troncales, mientras que las ratas 4 y 5 sería el control.

### 3.2.3 Inducción diabética

#### Selección del modelo de inducción diabética

A pesar de que los modelos experimentales basados en la modificación genética podrían ser muy útiles en este estudio, elegimos el modelo de inducción diabética mediante STZ por motivos económicos y lo seguimos de la forma en que está ampliamente descrito en la literatura, en experiencias similares a la nuestra. La dosis óptima para los especímenes se determinó en la puesta a punto, alcanzándose un equilibrio de seguridad y efectividad de 65mg/kg, que explicamos a continuación.

#### Protocolo de Inducción diabética

- Peso de todas las ratas.
- Preparación de Estreptozotocina
  - Solución tampón: 50mM de citrato sódico (pH4,5).
  - Disolución de Estreptozotocina en 1ml de solución tampón con una concentración final de 10mg/ml. (La disolución debe prepararse previa a la inyección, no más de 5 minutos antes).
- Inyección con jeringa de 3 ml y aguja de 23 Gauge, de 65 mg/Kg de solución de estreptozotocina intraperitoneal.
- Vuelta a las cajas con alimentación libre y agua azucarada al 10%, el mismo día del procedimiento.
- Día 2: se vuelve a agua no azucarada.
- Día 10: test de glucosa en ayunas con gota de sangre venosa de la cola.
- Día 12: test de glucosa sin ayunas con gota de sangre venosa de la cola.



- Se consideraron diabéticas si presentaban glucemia superior a 150 mg/dl en ayunas o superior a 200mg/dl sin ayunas.

### 3.2.4 Generación de isquemia en miembro inferior

#### Protocolo de isquemia

- Inducción anestésica con isoflorano al 4% y mantenimiento con isoflorano al 2%.
- Procedimiento quirúrgico:
  - Afeitado de la pared abdominal y del muslo.
  - Limpieza con solución de betadine.
  - Incisión abdominal media y transversa a nivel del muslo izquierdo.
  - Ligadura de AIC izquierda en la bifurcación aórtica y AFC previa a la salida safeno-femoral con seda de 5/0 y de las ramas asociadas, seccionándolas, en extremidad posterior izquierda.



Figura 10: Fotografías intraoperatorias de las zonas de ligadura. A la derecha exposición trasperitoneal de paquete vascular iliaco común izquierdo ligado y seccionado. A la izquierda exposición y ligadura de paquete vascular femoral y ramas tributarias.

- Aleatorización de casos y controles 2:1. Siguiendo con el orden de la numeración inicial y previa a la inducción diabética, el cuarto y

quinto especímenes de cada tanda de cinco se consideraron controles y por lo tanto no recibieron tratamiento con células troncales.

- Inserción de células troncales en los especímenes caso.
  - Manteniendo al animal con anestesia general (isoflurano al 2%) se realizó inserción de  $10^6$  células pluripotenciales en 5 alícuotas: dos alícuotas para el tejido muscular adyacentes a la ligadura de femoral común, y 3 alícuotas en el recorrido del vaso en el muslo y pierna.

### **3.2.5 Protocolo de seguimiento**

El control de la diabetes se realizó al décimo día en ayunas y al undécimo sin ayuno.

De forma reglada, cada 48 horas, los especímenes fueron valorados en compañía del personal veterinario experto del animalario, utilizando la tabla validada, que valoraba la pérdida de peso, los cambios en el pelaje, la deshidratación (por pliegue cutáneo), la actividad, la cojera, cianosis, contractura, aparición de lesiones y mutilación, teniendo cada ítem tenía una valoración numérica en función de su gravedad (tabla 12).

Se estableció un punto de corte para la valoración de cambio en el tratamiento de 7 puntos y una situación de no retorno o de sacrificio necesario al alcanzar 17 puntos o una pérdida de peso mantenida en 3 mediciones consecutivas de más de un 15% con respecto a la medida anterior.

La determinación de mejora o no mejora final se hizo mediante curva de tendencia, en la que la inclinación descendente se comprendió como mejoría clínica tanto general como isquémica.

| UMERO RATA      |                              |                         |             |    |    |    |                  |    |         |    |    |    |    |    |    |  | FINAL GRUPO B |
|-----------------|------------------------------|-------------------------|-------------|----|----|----|------------------|----|---------|----|----|----|----|----|----|--|---------------|
| CODIGO          |                              |                         |             |    |    |    |                  |    |         |    |    |    |    |    |    |  |               |
| GRUPO           |                              |                         |             |    |    |    |                  |    |         |    |    |    |    |    |    |  |               |
| PESO DIA 0      |                              |                         |             |    |    |    |                  |    |         |    |    |    |    |    |    |  |               |
|                 |                              |                         | 2           | 7  | 10 |    | CONTROL DIABETES |    | CIRUGIA |    | 15 | 17 | 19 | 21 | 23 |  |               |
|                 |                              |                         |             |    | SI | NO |                  |    |         |    |    |    |    |    |    |  |               |
| PESO            | SIN CAMBIOS                  |                         | 0           | 0  | 0  | 0  | 0                | 0  | 0       | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 | PERDIDA 5-10%                |                         | 1           | 1  | 1  | 1  | 1                | 1  | 1       | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 | PERDIDA 10-15%               |                         | 2           | 2  | 2  | 2  | 2                | 2  | 2       | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |  |               |
|                 | PERDIDA 15-20%               |                         | 3           | 3  | 3  | 3  | 3                | 3  | 3       | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  |  |               |
|                 | PERDIDA >20%                 |                         | 17          | 17 | 17 | 17 | 17               | 17 | 17      | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 |  |               |
| ASPECTO general | PELAJE                       | BLANCO                  | 0           | 0  | 0  | 0  | 0                | 0  | 0       | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | ALTERADO                | 1           | 1  | 1  | 1  | 1                | 1  | 1       | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 |                              | MUY ALTERADO            | 2           | 2  | 2  | 2  | 2                | 2  | 2       | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |  |               |
|                 | DESHIDRATACIÓN               | NO                      | 0           | 0  | 0  | 0  | 0                | 0  | 0       | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | LEVE                    | 1           | 1  | 1  | 1  | 1                | 1  | 1       | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 |                              | MODERADO                | 2           | 2  | 2  | 2  | 2                | 2  | 2       | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |  |               |
|                 |                              | SEVERA                  | 17          | 17 | 17 | 17 | 17               | 17 | 17      | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 |  |               |
|                 | ACTIVIDAD                    | IGUAL                   | 0           | 0  | 0  | 0  | 0                | 0  | 0       | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | DISMINUIDA              | 1           | 1  | 1  | 1  | 1                | 1  | 1       | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 |                              | ESCASA RESP A ESTIMULOS | 2           | 2  | 2  | 2  | 2                | 2  | 2       | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |  |               |
| COMATOSA        |                              | 17                      | 17          | 17 | 17 | 17 | 17               | 17 | 17      | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 |    |  |               |
| EXTREMIDAD      | COLOR                        | ROSADA                  | <div></div> |    |    |    |                  |    |         | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | CIANOTICA               |             |    |    |    |                  |    |         | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 | COJERA                       | NO                      |             |    |    |    |                  |    |         | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | LEVE                    |             |    |    |    |                  |    |         | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 |                              | IMPORTANTE              |             |    |    |    |                  |    |         | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |  |               |
|                 | CONTRACTURA                  | NO                      |             |    |    |    |                  |    |         | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | SI                      |             |    |    |    |                  |    |         | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |  |               |
|                 | ULCERAS/LESIONES DE DECUBITO | NO                      |             |    |    |    |                  |    |         | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | SI                      |             |    |    |    |                  |    |         | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  | 2  |  |               |
|                 | MUTILACION                   | NO                      |             |    |    |    |                  |    |         | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |  |               |
|                 |                              | SI                      |             |    |    |    |                  |    |         | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 | 17 |  |               |
|                 | TOTAL                        |                         |             |    |    |    |                  |    |         |    |    |    |    |    |    |  |               |

Tabla 12. Escala clínica de isquemia y estado general generada a raíz de la experiencia previa y utilizada durante la fase experimental.

### **3.2.6 Protocolo de Sacrificio**

El sacrificio se realizó en cada grupo mediante inyección intracardiaca de cloruro potásico bajo anestesia inhalatoria con Sevorane al 5%, al décimo día postquirúrgico en el grupo de seguimiento a corto plazo, y a los 28 días postquirúrgicos en el grupo de seguimiento largo plazo.

### **3.2.7 Protocolo de análisis histopatológico**

#### *Obtención de las muestras para su estudio histológico*

Tras el sacrificio, las muestras fueron suspendidas inmediatamente en una solución de formaldehído al 4% durante 72 horas.

Se procedió a la deshidratación con una serie de etanol de concentraciones crecientes (70, 80, 96 y 100°), tras unos baños en tolueno, se incluyeron en parafina (Panreac Química SAU®, Barcelona, España).

Se efectuaron cortes de 5 micras con un microtomo Micron HM360 en el eje transversal de la pieza para la realización de tinciones.

Posteriormente se procedió a su evaluación mediante distintas técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

En todos los casos las muestras se examinaron utilizando un microscopio Axioplan 2 (Zeiss®, Oberkoche, Alemania). Las imágenes digitales se realizaron con una cámara Axiocam HCR (Zeiss®, Oberkoche, Alemania) y fueron almacenadas en formato *TIFF*.

Las técnicas histológicas que se realizaron fueron las siguientes:

- Tinción con hematoxilina/eosina (H/E).

Se realizó una tinción rutinaria de los cortes de cada muestra con H/E, siguiendo el siguiente protocolo:

- Se desparafinaron los cortes de tejido con xilol (3 cambios de 5 minutos cada uno) y se rehidrataron los tejidos sumergiéndolos en una serie de alcoholes en concentración decreciente (100%,96%,70%) y por último se sumergieron en baño de agua.
- Tinción con Hematoxilina según Carazzi (159) durante 15 minutos.
- Para virar el color de la hematoxilina se lavaron las muestras con agua durante 15 minutos.
- Tinción con eosina acuosa al 1% (Panreac Química SAU®, Barcelona, España).
- Se deshidrataron los cortes y se realizó el montaje con resina EUKITT® (Labolan, España).

- Tricrómico de Masson.

Esta técnica histológica está diseñada para el estudio de las fibras de colágeno y para la evaluación de la fibrosis. El colágeno destaca por el color azul intenso que adquieren. El protocolo es el siguiente:

- Se desparafina e hidrata en agua destilada.
- Como el material está fijado en formaldehído se realiza un mordentaje (proceso que favorece la coloración mediante el uso de solución de Bouin como fijador) durante toda la noche a temperatura ambiente.

- Se enfría durante 10 minutos y se lava en agua destilada hasta que desaparezca el amarillo.
  - Tinción con hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos.
  - Lavado en agua corriente durante 10 minutos y enjuagado en agua destilada.
  - Tinción con una solución de fucsina ácida-escarlata de Biebrich-durante 15 minutos.
  - Lavado con agua destilada.
  - Diferenciación con solución de ácido fosfomolibdico-fosfotungstico al 5% durante 15 minutos.
  - Contrastado con una solución de azul de anilina 5-10 minutos.
  - Lavado con agua destilada.
  - Diferenciado en la solución de ácido acético 1% durante 3-5 minutos.
  - Deshidratado, aclarado y montaje con un medio resinoso.
- Técnicas de inmunohistoquímica.

Para valorar el grado de vascularización se eligió el anticuerpo CD31 de Biorbyt® (orb229364).

Para el estudio de la reacción macrofágica se usaron: como marcador general de los macrófagos el CD68 de BioRad® (MCA341GA) y para detectar los macrófagos M2 el anticuerpo anti CD206 de Biorbyt® (orb180464).

    - Se bloqueó las peroxidasas endógenas tratando los cortes de tejido con 100 microlitros de una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

- Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-TWEEN.PBS (Sigma-Aldrich, Alemania). Tween 20 (Calbiochem, Alemania)
- Se realizó el bloqueo cubriendo los cortes de tejido con 100 microlitros de PBS 10% de suero bovino fetal a temperatura ambiente durante una hora en la cámara húmeda.
- Transcurrido el tiempo se decantó la solución y se añadieron 100 microlitros de una disolución 1/50 del anticuerpo primario y se realizó una incubación “overnight” en la cámara húmeda a 4°C.
- Se eliminó la disolución del anticuerpo primario y se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos de duración cada uno.
- A continuación se utilizó como sistema de revelado el Kit Masvision Universal Polivalente® (Máster Diagnóstica, España), por ser altamente sensible y proporcionar una baja tinción de fondo. Se añadieron sobre la sección de tejido 100 µl del complejo constituido por polímero conjugado con peroxidasa y la fracción de inmunoglobulina F (ab) que proporciona el kit. Se incubó a temperatura ambiente 15 minutos.
- A continuación se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.
- Se deshidrataron las muestras mediante pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, se aclararon en xilol y se montaron con EUKITT® (Labolan, España).

En todos los casos se realizó un control negativo utilizando secciones de tejido en las que se realizó la técnica pero omitiendo el paso de incubación con anticuerpo primario.

- Técnicas de inmunofluorescencia.

En cortes histológicos también se realizaron estudios de inmunofluorescencia para localizar las células teñidas con CellTracker CM-Dil en los tejidos tratados a lo largo del tiempo. Para la tinción de las células se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Oregon, USA) con pequeñas modificaciones antes de inyectarse sobre los diferentes grupos de estudio; tras lavar las muestras con PBS, se les añadió 90  $\mu$ l de Dil liofilizado en 50  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido) sobre 100ml de HBBS dejándolo incubar 5 minutos a 37°C y posteriormente 4 minutos a 4°C, a continuación se lavó la placa de cultivo con PBS y se añadió el medio de cultivo convencional dejándolo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las muestras fueron analizadas mediante fluorescencia en un microscopio invertido Leyca DMI 6000.

Estos análisis se realizaron en las muestras a las 24 horas y 1 semana. No se realizaron estudios a 1 mes debido a que la tinción con Dil es citoplasmática y se va perdiendo logarítmicamente con las divisiones celulares y con el tiempo, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El objetivo de esta tinción fue confirmar que las células inyectadas se mantenían en el lugar de su inyección al menos 1 semana, con lo que podría afirmarse que si existe efecto sobre la cirugía es asociado a la presencia de las CMDL.



### **3.2.8 Criterios de valoración de los parámetros histológicos en las muestras de tejido**

#### *Densidad del tejido cicatricial*

Basándonos en la definición histológica de cada tipo de tejido conjuntivo, hemos considerado:

- Tejido conjuntivo laxo: tejido celular con fibras de colágeno, sobre todo tipo I, finas y escasas y abundante sustancia extracelular.
- Tejido conjuntivo denso: tejido conjuntivo poco celular y con gran abundancia de fibras colágenas, en especial colágeno I, escasez relativa de sustancia fundamental.

#### *Valoración del grado de infiltración de células inflamatorias*

En las preparaciones de H/E se realizó un recuento de las células inflamatorias en 20 microfotografías de campos aleatorios y con un objetivo de 400x, se calculó la media y error standard en cada caso de estudio.

#### *Valoración de la vascularización*

Para evaluar la cantidad de vasos neoformados se llevó a cabo el recuento del número pequeños vasos (capilares, arteriolas/vénulas) presentes en cada una de las muestras incluidas en el estudio. Para detectar dichos vasos, éstos fueron marcados mediante técnica inmunohistoquímica utilizando el marcador de células endoteliales CD31.

Se realizó una media aritmética y error standard del número de pequeños vasos contados en 20 microfotografías realizadas con un objetivo 400x en cada uno de los casos de estudio.

*Densidad capilar alrededor de las fibras musculares.*

El número capilares se valoró mediante el programa ImageJ®, (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>), del National Institute of Health de Estados Unidos, en campos de 200x de la región próxima al daño isquémico.

# **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DIFERENCIACIÓN DE ASCs

Tras descongelar las ASCs y antes de su uso en estas experiencias se seleccionaron 200000 células para comprobar que cumplieran los criterios IFATS (International Federation of Adipose Therapeutics and Science). Para ello se realizó una citometría de flujo para identificar la presencia de 3 marcadores de superficie y la ausencia de otros 3 y posteriormente se realizó una diferenciación a tejido adipogénico y a tejido osteogénico (160).

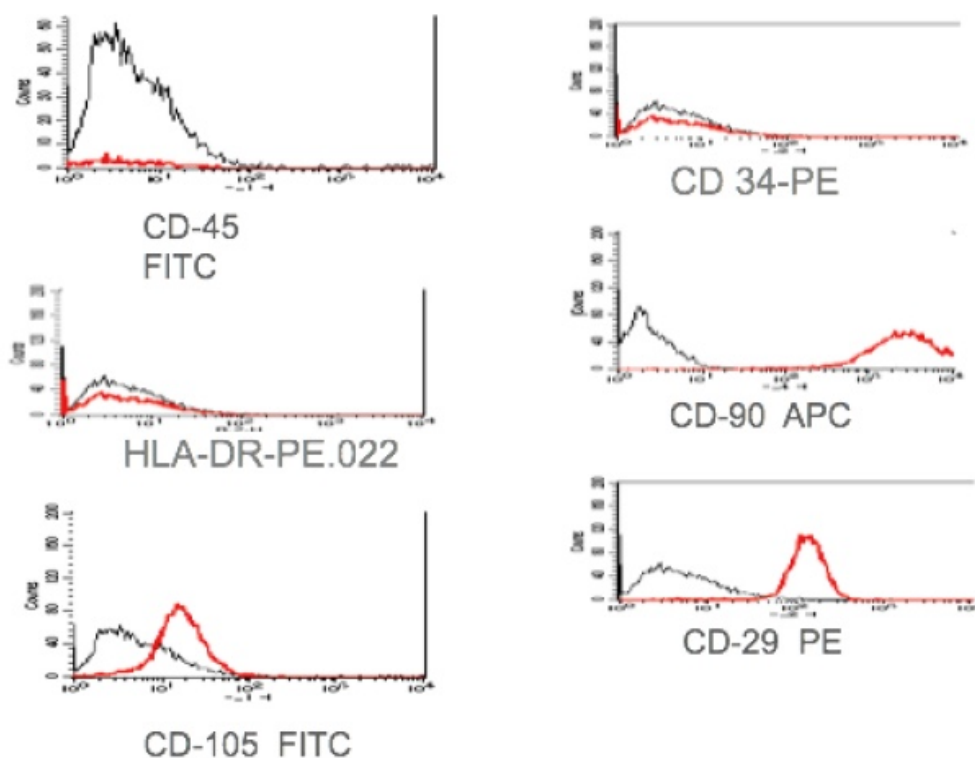


Figura 11. Citometría de flujo que demuestra valores positivos para CD90, CD105 y CD29 y valores negativos para CD34, HLA DR y CD45.

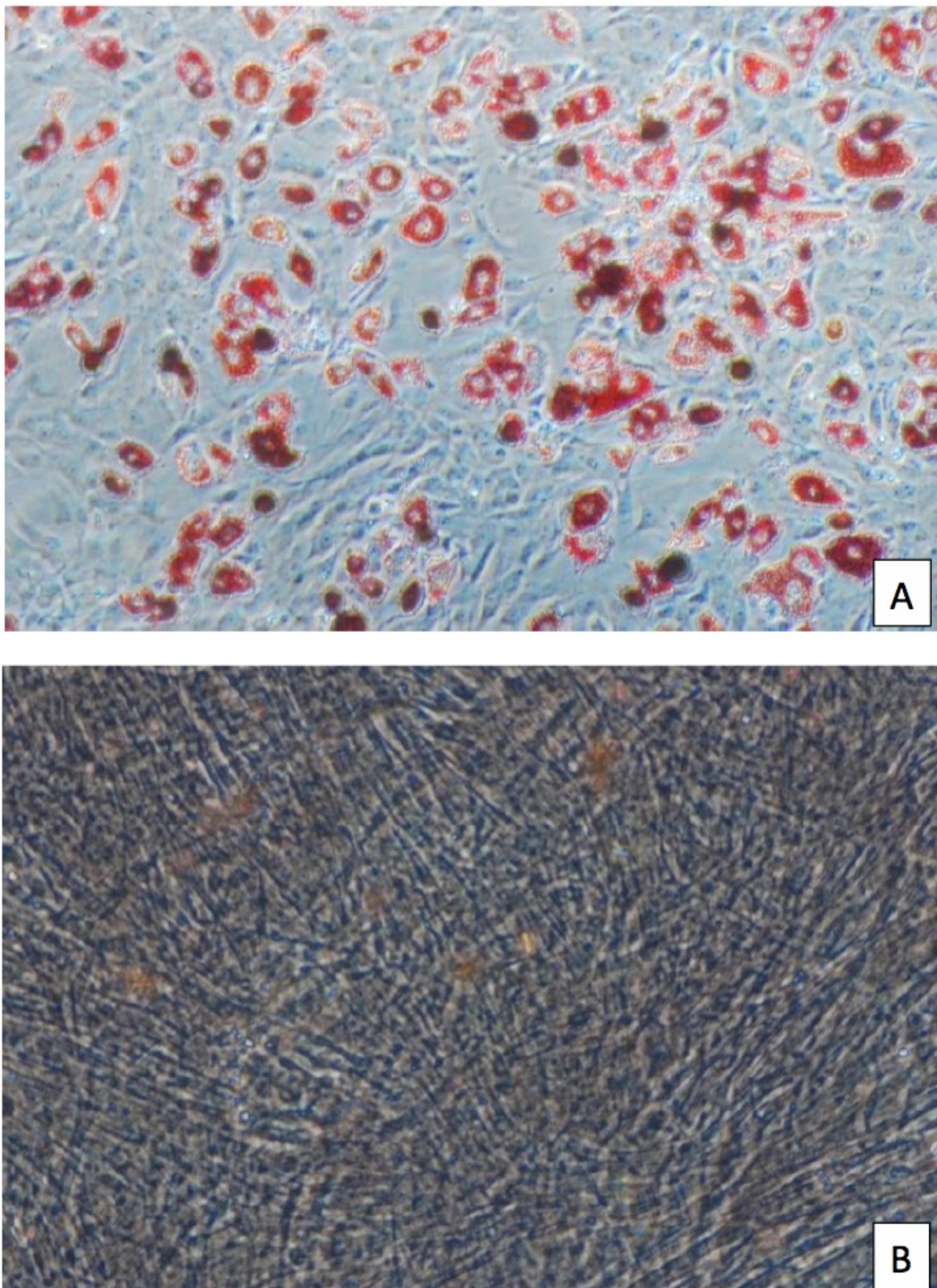


Figura 12. A. Diferenciación adipogénica en la que se evidencian la acumulación de lípidos a través de tinción Oil Red O (ORO). B. Diferenciación osteogénica: a través de una tinción Alizarin Red S se muestran los depósitos ricos en calcio secretados a la matriz extracelular por los osteocitos.

## 4.2 FASE DE PUESTA A PUNTO

### 4.2.1. 1ª Experiencia: Comparativa de modelos isquémicos

De los dos especímenes intervenidos mediante ligadura femoral exclusiva ninguno presentó repercusión isquémica alguna. No se objetivó cianosis, cojera, contractura o ulceración, durante los tres días que se realizó el seguimiento.

Dos de los tres modelos de ligadura femoral e iliaca presentaron signos de isquemia: cianosis y contractura, con cojera. El tercer espécimen presentó cianosis postoperatoria con recuperación espontánea a las 24 horas de la cirugía.

### 4.2.2 2º Experiencia: Diabetes e isquemia

Las 6 ratas inducidas presentaban un peso medio de 236.5 (220-250). La dosis de estreptozotocina utilizada fue de 0,65mg/kg (tabla 13).

| Rata | Peso | Dosis STZ (mg) | Vol STZ (ml) |
|------|------|----------------|--------------|
| 1    | 250  | 16,315         | 1,632        |
| 2    | 232  | 15,080         | 1,508        |
| 3    | 242  | 15,730         | 1,573        |
| 4    | 244  | 15,860         | 1,586        |
| 5    | 220  | 14,300         | 1,430        |
| 6    | 230  | 14,950         | 1,495        |

Tabla 13. Dosis y volumen de estreptozotocina utilizados en la 2ª experiencia previa a la fase de experimentación.

Las primeras 48 horas tuvieron solución glucosada al 10% en vez de agua.

Al décimo y undécimo día se realizaron mediciones de la glucemia.

Se consideraron dos opciones como puntos de corte de diabetes: en ayunas una glucemia superior a 150 y sin ayunas una glucemia superior a 200.

Con el criterio de glucemias sin ayunar, se obtuvieron 5 ratas diabéticas, de las cuales, las 3 que presentaron glucemias superiores cumplieron el criterio de diabetes en ayunas. Las otras dos, aunque presentaron una glucemia elevada (140 y 146), no alcanzaron el punto de corte.

| Rata | Peso | Glucemia día 10 ( sin ayunas) | Glucemia día 11 (en ayunas) |
|------|------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1    | 285  | 227*                          | 140                         |
| 2    | 240  | 589*                          | 338+                        |
| 3    | 307  | 172                           | 123                         |
| 4    | 233  | 421*                          | 291+                        |
| 5    | 252  | 220*                          | 146                         |
| 6    | 266  | 506*                          | 155+                        |

Tabla 14. Glucemias obtenidas tras la inducción con estreptozotocina con y sin ayunas, en 2º experiencia previa.

\* ratas que superaron el criterio de diabetes sin ayunas (glucemia superior a 200mg/l).

+ Ratas que superaron el criterio de diabetes en ayunas (glucemia superior a 150mg/l).

El duodécimo día de seguimiento, día de la cirugía isquémica, se comprobó como signo de alerta gran humedad en ambas jaulas, que se atribuyó a poliuria secundaria a la diabetes.

Hubo un exitus postquirúrgico inmediato sin recuperación de la anestesia (especimen 4). El resto sobrevivieron al seguimiento de 4 días.

| Rata | Cirugía  | Día 1                                       | Día 2  | Día 3  | Día 4  |
|------|----------|---|--|--|--|
| 1    | Normal   | Peso igual<br>Cojera leve<br>Color rosado   | Peso igual<br>Cojera leve<br>Color rosado          | Peso igual<br>Cojera leve<br>Color rosado          | Peso igual<br>Cojera leve<br>Color rosado          |
| 2    | Cianosis | Peso igual<br>Cojera leve<br>Cianosis       | Peso igual<br>Cojera grave<br>Cianosis             | Peso igual<br>Cojera grave<br>Cianosis             | Peso igual<br>Cojera grave<br>Cianosis             |
| 3    | Cianosis | Peso<5-10%<br>Cojera leve<br>Cianosis       | Peso<5-10%<br>Cojera grave<br>Lesiones<br>Cianosis | Peso<5-10%<br>Cojera grave<br>Lesiones<br>Cianosis | Peso<5-10%<br>Cojera grave<br>Lesiones<br>Cianosis |
| 4    | Exitus   | -   | -  | -  | -  |
| 5    | Cianosis | Peso igual<br>Cojera importante<br>Cianosis | Peso igual<br>Cojera importante<br>Cianosis        | Peso igual<br>Cojera leve<br>Rosado                | Peso igual<br>Cojera leve<br>Rosado                |
| 6    | Normal   | Peso igual<br>No Cojera<br>Rosado           | Peso igual<br>No Cojera<br>Rosado                  | Peso igual<br>No Cojera<br>Cianosis                | Peso igual<br>No Cojera<br>Cianosis                |

Tabla 15. Escala de seguimiento clínico utilizada durante la 2ª experiencia previa.

Al vigésimo segundo día se procedió al sacrificio, y se pesaron las extremidades, tras desarticularlas, presentando mayor peso las patas sanas que las intervenidas.

| Rata | Peso | Peso Pata Sana | Peso Pata Intervenida |
|------|------|----------------|-----------------------|
| 1    | 308  | 19.5           | 16                    |
| 2    | 262  | 13             | 13                    |
| 3    | 323  | 19             | 18                    |
| 5    | 270  | 15.5           | 15                    |
| 6    | 287  | 16             | 15.5                  |

Tabla 16. Pesos de la rata y de las extremidades desarticuladas en 2ª experiencia previa.



### 4.2.3 3° experiencia: Diabetes a mayor dosis de Estreptozotocina e Isquemia

A 5 ratas con pesos comprendidos entre 340 y 370 gramos, se les indujo diabetes con una dosis mayor de Estreptozotocina que en la prueba previa (70mg/Kg vs 65mg/Kg).

También se comprobó la glucemia con y sin anestesia de los animales para comprobar si los fármacos anestésicos podían alterar los valores de glucemia.

| Rata | Peso | Glucemia sin anestesia | Glucemia con anestesia | Volumen de STZ (ml) |
|------|------|------------------------|------------------------|---------------------|
| 1    | 370  | 98                     | 100                    | 2,8                 |
| 2    | 347  | 101                    | 113                    | 2,61                |
| 3    | 360  | 82                     | 99                     | 2,7                 |
| 4    | 340  | 103                    | 109                    | 2,55                |
| 5    | 350  | 102                    | 122                    | 2,6                 |

Tabla 17. Pesos, glucemias con y sin anestesia y cantidad de estreptozotocina utilizada en 3° experiencia previa

Tras la inducción diabética se les sustituyó el agua por solución glucosada al 10% durante 48 horas.

En esta experiencia se comprobó que la tabla de seguimiento, era insuficiente, ya que sobreestimaba el efecto de la cirugía sobre el estado de la rata. Se modificó obteniendo la tabla final que es la descrita en el apartado de material y métodos.

Durante el seguimiento fallecieron 4 de las 5 ratas. Lo cual nos hizo descartar el aumento de dosis de STZ.

### 4.3 FASE DE DESARROLLO DEL ESTUDIO

#### 4.3.1 Grupo de seguimiento a largo plazo

##### Inducción diabética

Se seleccionaron 14 ratas con pesos comprendidos entre 180-250 gr.

Tras la inducción con estreptozotocina a la concentración 0,65mg/kg, se obtuvieron 10 ratas diabéticas y 4 no diabéticas (71%), con el criterio de glucemia mayor a 200 en ayunas.

| Rata | Glucemia | Diabetes | Rata | Glucemia | Diabetes |
|------|----------|----------|------|----------|----------|
| 1    | 468      | Sí       | 8    | 111      | No       |
| 2    | 319      | Sí       | 9    | 220      | Sí       |
| 3    | 117      | No       | 10   | 126      | No       |
| 4    | 482      | Sí       | 11   | >600     | Sí       |
| 5    | >600     | Sí       | 12   | 235      | Sí       |
| 6    | 93       | No       | 13   | >600     | Sí       |
| 7    | 389      | Sí       | 14   | >600     | Sí       |

Tabla 18. Ratas utilizadas en la fase experimental a largo plazo, glucemias y criterio de diabetes.

### Supervivencia

5 de las 10 ratas diabéticas sobrevivieron a todo el seguimiento, con una supervivencia acumulada del 80% a los 2 días de la cirugía.

De 5 exitus, 3 estuvieron en relación con la cirugía (exitus en los 5 primeros días) y 2 fueron sacrificios por lesiones extensas (punto de no retorno).

Las ratas que fallecieron eran las que presentaban mayor glucemia (ratas 4, 5, 11, 13 y 14).

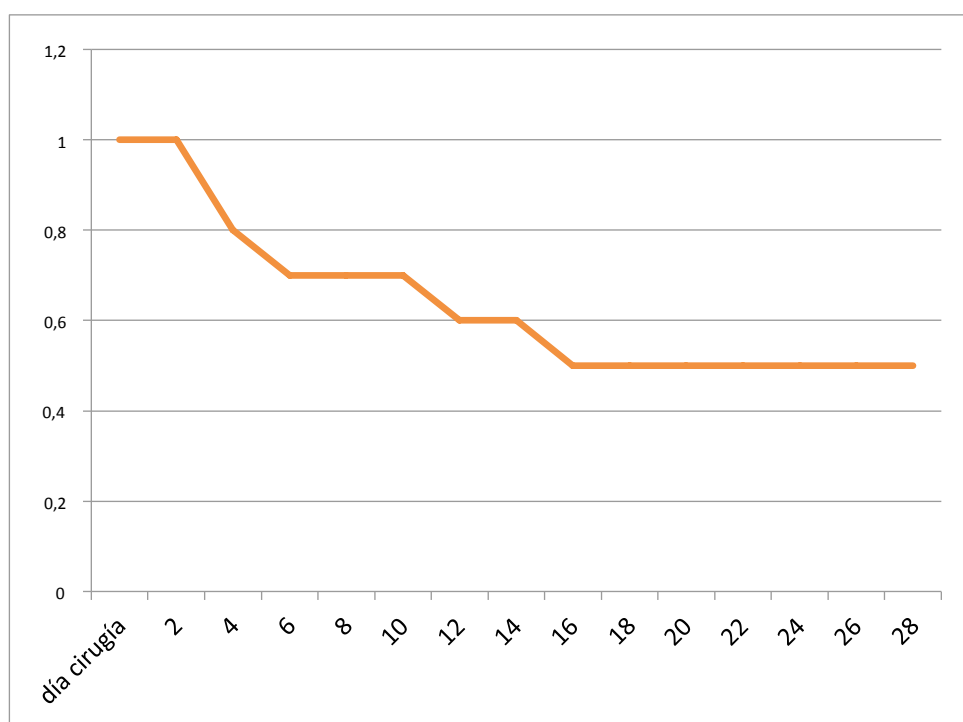


Figura 13. Supervivencia acumulada del grupo largo con diabetes e isquemia y tratadas con células troncales mesenquimales.

*Cambios en el peso*

Entre los individuos que sobrevivieron, hubo tendencia al aumento de peso, entre un 8 y un 42%. Se observó relación con la glucemia, ya que los que presentaron mayor glucemia (las ratas 1,2 y 7, con glucemias de 468, 319 y 389, respectivamente), apenas aumentaron su peso, mientras que las ratas 9 y 12 con glucemias de 220 y 235 respectivamente aumentaron más.

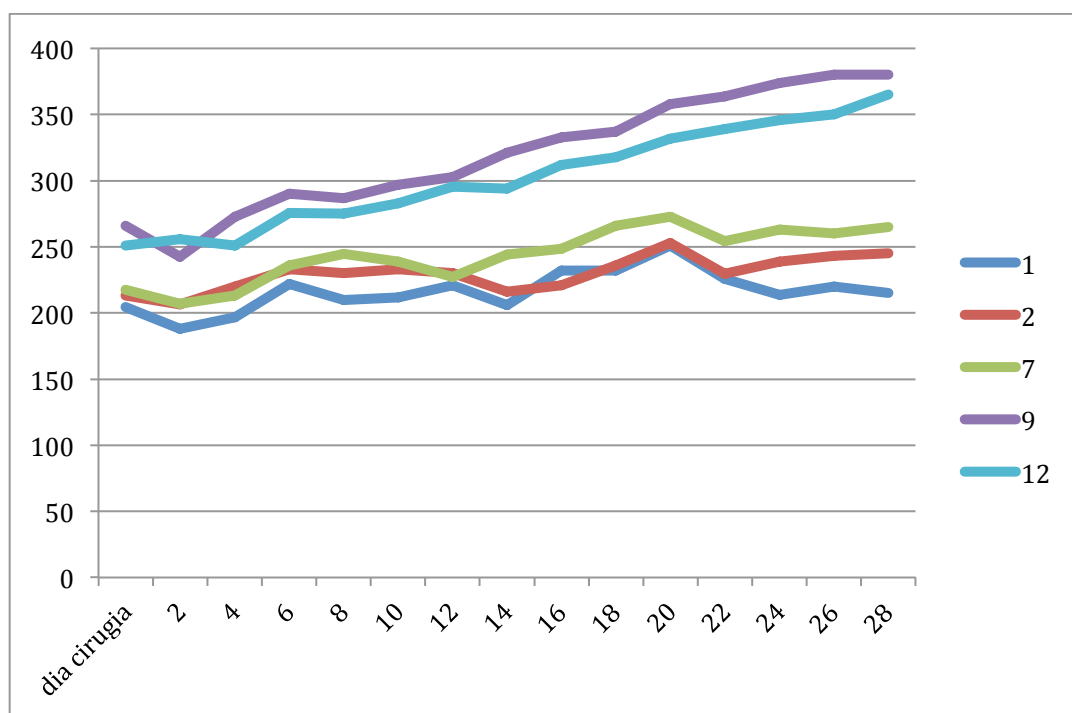


Figura 14. evolución de los pesos durante el seguimiento a largo plazo.

*Estado general*

En lo referente a la escala clínica de estado general, las ratas que completaron la fase de seguimiento clínico presentaron una mejoría paulatina desde la cirugía hasta el final de la observación.

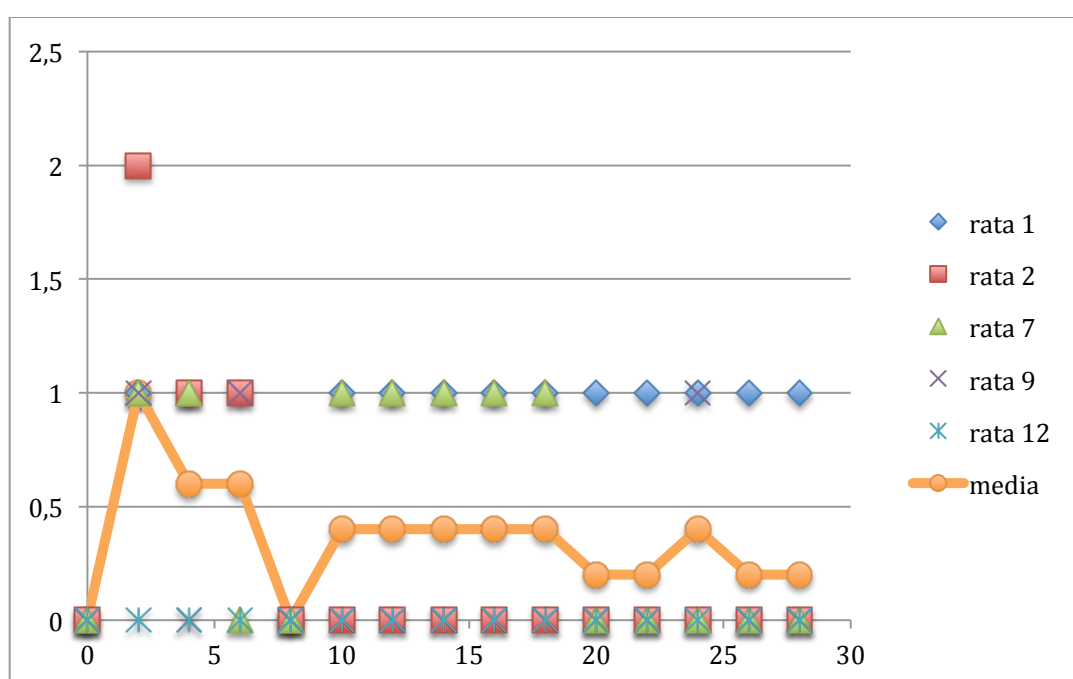


Figura 15. Evolución del estado general en el grupo de seguimiento a largo plazo.

Isquemia

Asimismo, la escala subjetiva de isquemia también presentó mejoría en las ratas que completaron el estudio.

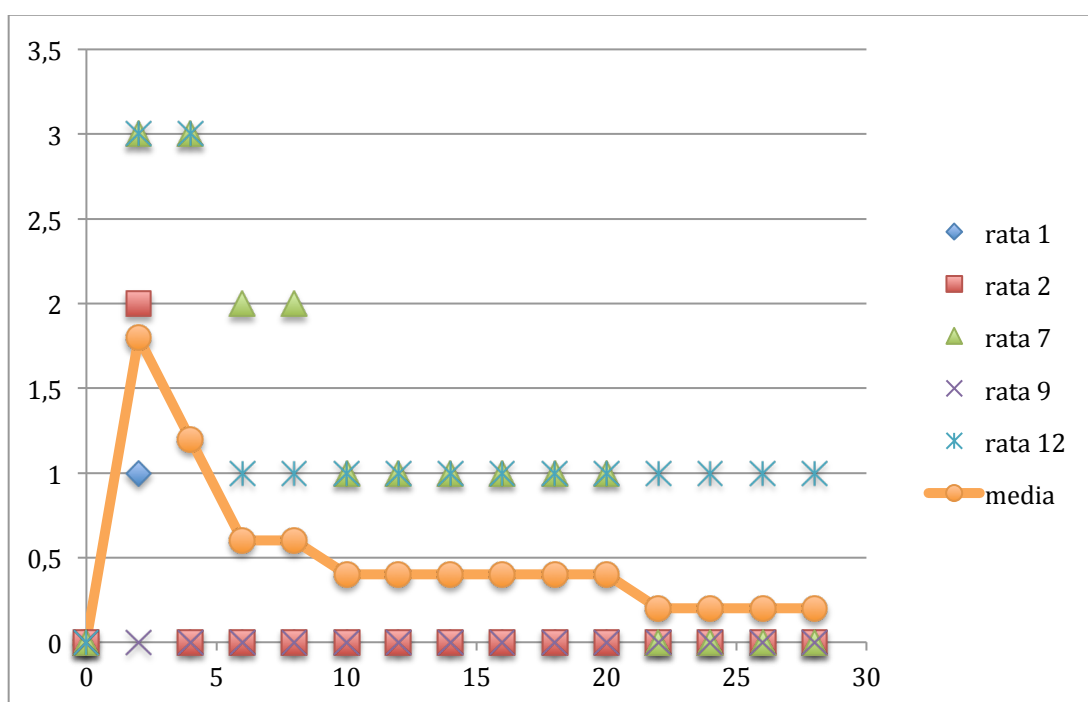


Figura 16. Evolución de la clínica isquémica en el grupo de seguimiento a largo plazo.

### 4.3.2 Grupo de seguimiento a corto plazo

#### Características de la muestra

De las 40 ratas a las que se indujo la diabetes 3 fallecieron durante el periodo de diabetogénesis y 8 no pasaron el punto de corte establecido de 200 mg/dl de glucemia en ayunas, con un 72,5% de inducción diabética.

De las 29 ratas restantes, se utilizaron 12 controles (glucemia media de 460,3) y 17 casos (glucemia media 436,2).

Asimismo se comprobó que los grupos control y caso eran comparables en los valores de peso y glucemia. Para ello se llevó a cabo la prueba no paramétrica U de Mann Whitney y W de Wilcoxon, tras haber comprobado que tanto peso como glucemias no seguían una distribución normal, cuya hipótesis nula es la de igualdad de distribuciones.

## Estadísticos descriptivos

|          | N  | Media    | Desviación estándar | Mínimo | Máximo | Percentiles |              |          |
|----------|----|----------|---------------------|--------|--------|-------------|--------------|----------|
|          |    |          |                     |        |        | 25          | 50 (Mediana) | 75       |
| Peso     | 29 | 200,2241 | 27,65850            | 163,00 | 247,00 | 177,5000    | 193,5000     | 230,2500 |
| Glucemia | 29 | 446,2069 | 145,14017           | 171,00 | 600,00 | 317,5000    | 450,0000     | 600,0000 |
| Grupo    | 29 | ,5862    | ,50123              | ,00    | 1,00   | ,0000       | 1,0000       | 1,0000   |

## Rangos

| Grupo    |       | N  | Rango promedio | Suma de rangos |
|----------|-------|----|----------------|----------------|
| Peso     | Sin   | 12 | 14,46          | 173,50         |
|          | Con   | 17 | 15,38          | 261,50         |
|          | Total | 29 |                |                |
| Glucemia | Sin   | 12 | 16,33          | 196,00         |
|          | Con   | 17 | 14,06          | 239,00         |
|          | Total | 29 |                |                |

Tabla 19. Variables descriptivas de las ratas utilizadas en la fase experimental.

|                             | Peso              | Glucemia          |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| U de Mann-Whitney           | 95,500            | 86,000            |
| W de Wilcoxon               | 173,500           | 239,000           |
| Z                           | -,288             | -,724             |
| Sig. asintótica (bilateral) | ,773              | ,469              |
| Significación exacta        | ,777 <sup>a</sup> | ,499 <sup>a</sup> |

Tabla 20. Comparación mediante U de Mann-Whitney y W de Wilcoxon de los pesos y glucemia de los grupos casos y controles de la fase experimental. <sup>a</sup> No corregido para empates.

Tanto para el Peso ( $U_{MW} = 95.5$ ,  $Z = -.288$ ,  $p = .773$ ) como para la Glucemia ( $U_{MW} = 86$ ,  $Z = -.724$ ,  $p = .469$ ) se acepta la hipótesis nula, con lo que no puede afirmarse que existan diferencias significativas entre grupos.



### Supervivencia

En el grupo control hubo 6 exitus durante el seguimiento (mortalidad del 50%), mientras que en el grupo de casos hubo 4 exitus durante el seguimiento (mortalidad del 23,5%). Observándose diferencias significativas según se traten con o son células troncales (LRMC = 3.972,  $p = .046$ ).

**Medias y medianas para el tiempo de supervivencia**

| Con células | Media <sup>a</sup> |                |                                |                 | Mediana    |                |                                |                 |
|-------------|--------------------|----------------|--------------------------------|-----------------|------------|----------------|--------------------------------|-----------------|
|             | Estimación         | Error estándar | Intervalo de confianza de 95 % |                 | Estimación | Error estándar | Intervalo de confianza de 95 % |                 |
|             |                    |                | Límite inferior                | Límite superior |            |                | Límite inferior                | Límite superior |
| No          | 1,429              | ,202           | 1,033                          | 1,825           | 1,000      | .              | .                              | .               |
| Si          | 2,500              | ,500           | 1,520                          | 3,480           | 2,000      | .              | .                              | .               |
| Global      | 1,818              | ,263           | 1,302                          | 2,335           | 2,000      | ,159           | 1,689                          | 2,311           |

a. La estimación está limitada al tiempo de supervivencia más largo, si está censurado.

**Comparaciones globales**

| Chi-cuadrado          |       | gl | Sig. |
|-----------------------|-------|----|------|
| Log Rank (Mantel-Cox) | 3,972 | 1  | ,046 |

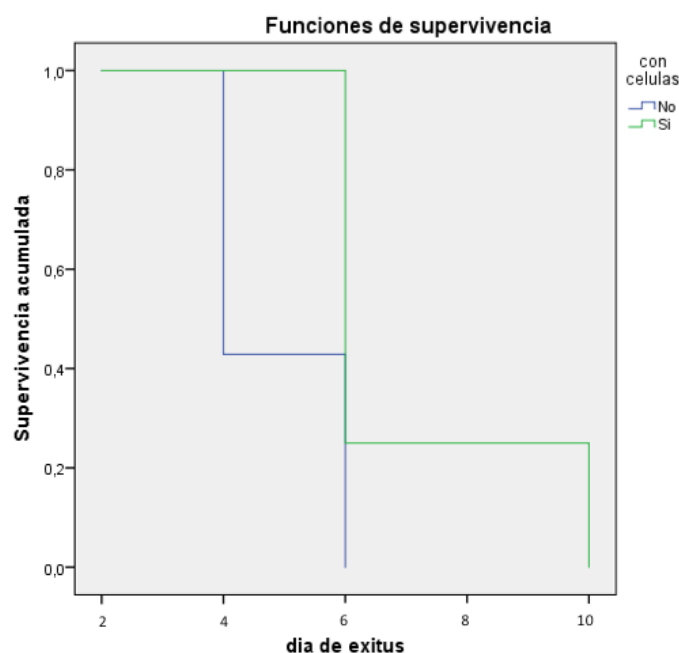


Tabla 21. Estudios de supervivencia en grupo casos y controles.

### Estado general

La escala clínica de estado general, en la que 0 fue el valor de una rata normal, hubo diferencias relevantes en los valores ajustados a individuo y día. En el grupo control se objetivó un valor medio de 1,2 con tendencia al aumento, mientras que el grupo caso el valor fue de 0,29 con una tendencia al descenso (figura 17), presentando una diferencia significativa en la comparación de medias independientes (0,013) (Tabla 22).

Al analizar el número de especímenes que mejoraron, 11 de 13 en el grupo con ASC, y 2 de 5 en el grupo sin ASC, no se alcanzó diferencia significativa ( $p=0,058$ ) (Tabla 23 y Figuras 18 y 19).

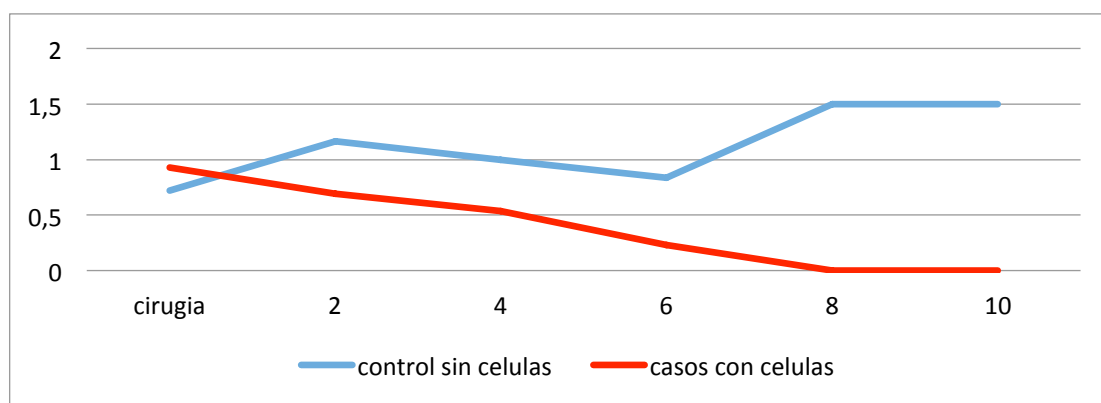


Figura 17. Comparación del estado general entre casos y controles, con escala cualitativa ordinal. Normalidad está definida por el valor 0.

### **Comparación de medias relativas a clínica general**

| Con células | Medias     |                |                                |                 |   |                   |         |
|-------------|------------|----------------|--------------------------------|-----------------|---|-------------------|---------|
|             | Estimación | Error estándar | Intervalo de confianza de 95 % |                 | Prueba de comparación de medias contraste bilateral |                   |         |
|             |            |                | Límite inferior                | Límite superior | Estadístico T                                       | Grado de libertad | Valor p |
| No          | 1,200      | ,519           | 1,584                          | 0,236           | 3,009   | 9,919             | 0,013   |
| Si          | 2,500      | ,699           |                                |                 |   |                   |         |

Tabla 22. Comparación de medias independientes relativas a la clínica general ajustada la mortalidad.

|                    | rata | día 2 | día 4 | día 6 | día 8 | día 10 | Mejora=1 |
|--------------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| Control-Sin<br>ASC | 1.6  | 1     | 2     | 2     | 0     | 2      | 0        |
|                    | 1.9  | 0     | 1     | 0     | 0     | 1      | 0        |
|                    | 1.12 | 0     | 1     | 0     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 1.14 | 0     | 1     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 2.1  | 1     | 1     | 0     | 2     | 3      | 0        |
| Caso-Con<br>ASC    | 1.1  | 1     | 2     | 0     | 1     | 0      | 1        |
|                    | 1.3  | 1     | 1     | 0     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 1.4  | 1     | 1     | 0     | 1     | 0      | 1        |
|                    | 1.5  | 1     | 1     | 1     | 1     | 0      | 1        |
|                    | 2.9  | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0        |
|                    | 2.12 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0        |
|                    | 3.1  | 3     | 0     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 3.2  | 2     | 1     | 0     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 3.4  | 1     | 0     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 3.5  | 1     | 1     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 3.6  | 1     | 1     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 3.7  | 1     | 0     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                    | 3.14 | 1     | 1     | 1     | 0     | 0      | 1        |

Tabla 23. Evolucion clínica y valoración de la mejora final en función de las curvas de tendencia.

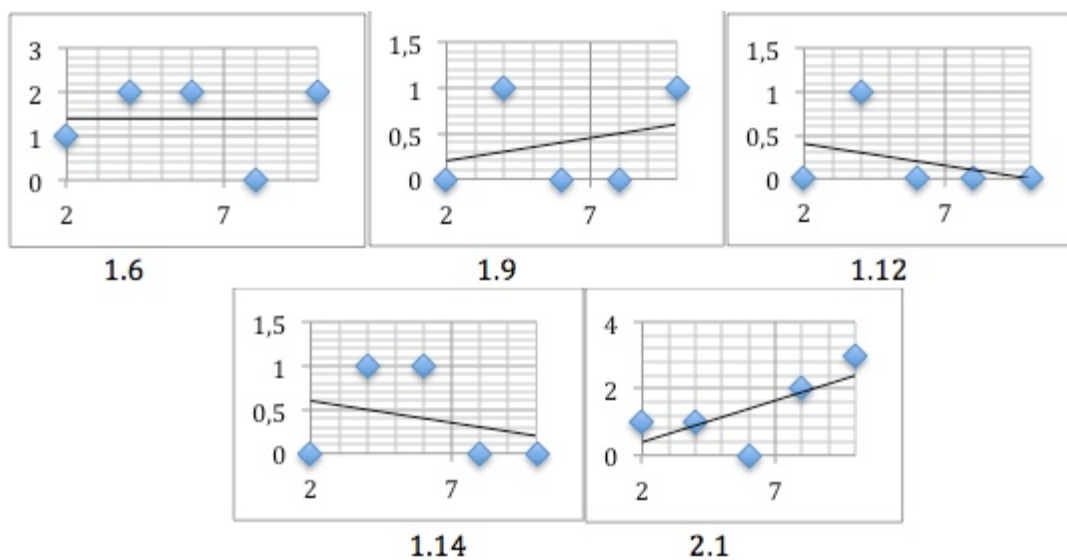


Figura 18. Curvas de evolución clínica general de grupo control.

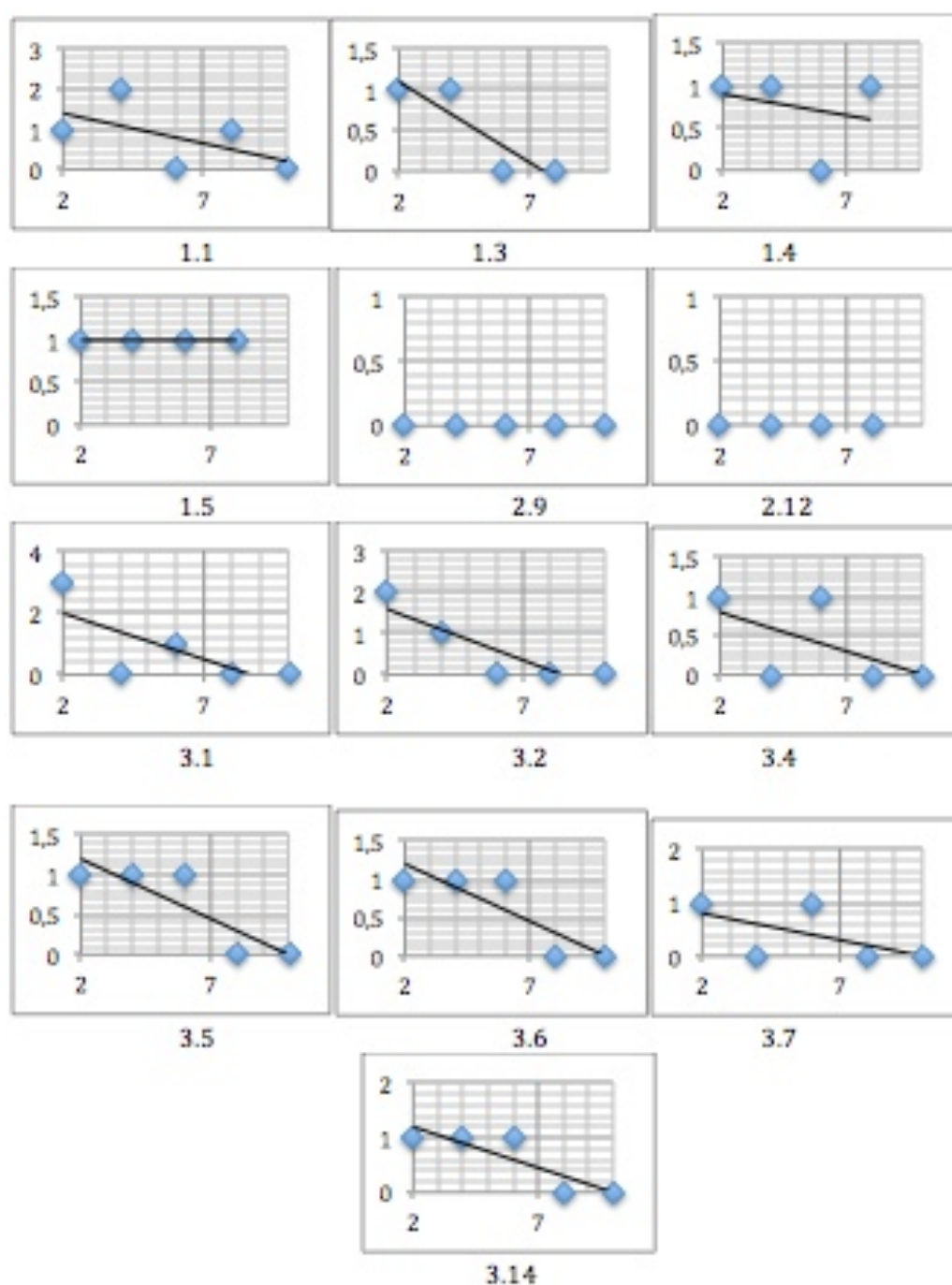


Figura 19. Curvas de evolución clínica general de grupo caso.

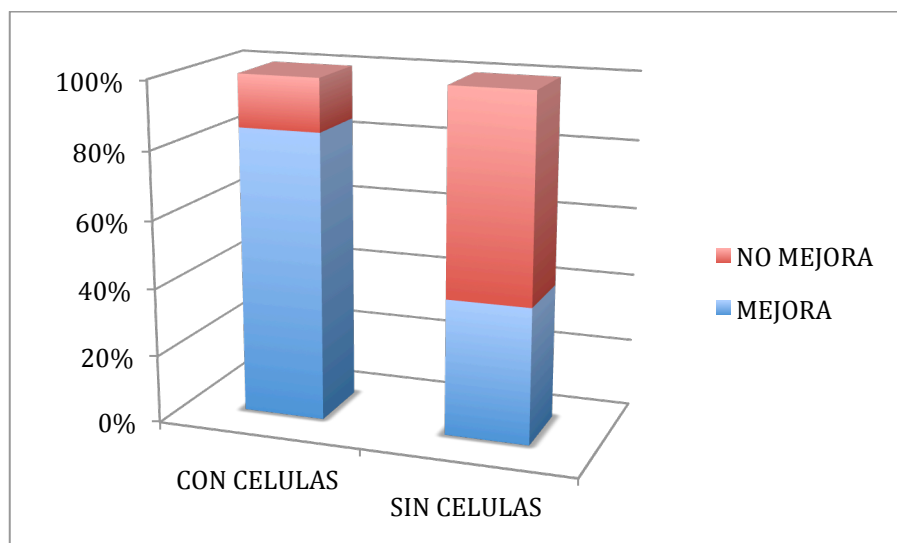


Figura 20. Valores porcentuales de ratas que presentaron mejoría general en relación al tratamiento con ASC o no.

#### Proporciones sobre mejora de clínica general.

| Proporciones sobre mejora de calidad general |                   |                 |            |                                |                 |                            |               |   |  |
|--|-------------------|-----------------|------------|--------------------------------|-----------------|----------------------------|---------------|---|--|
| Con células                                  | Proporciones      |                 |            |                                |                 |                            |               | Prueba de comparación de proporciones contraste bilateral |  |
|  | Número de mejoras | Tamaño muestral | Porcentaje | Intervalo de confianza de 95 % |                 |                            |               |   |  |
|  |                   |                 |            | Límite inferior                | Límite superior | Diferencia de proporciones | Estadístico Z | Valor p   |  |
| No   | 2                 | 5               | 40%        | 0,026                          | 0,918           | 0,446                      | 1,893         | 0,058   |  |
| Si   | 11                | 13              | 84.615%    |                                |                 |                            |               |   |  |

Tabla 24. Comparación de proporciones de mejora de clínica general ajustadas a mortalidad.

### Isquemia

En el análisis de la escala clínica de isquemia nos encontramos con valores, ajustados a individuo y día, similares en los supervivientes de los grupos control (1,53) y casos (1,69), sin significación estadística.

El estudio del número de especímenes que presentaron mejoría clínica isquémica tampoco obtuvo diferencias significativas. En el grupo con ASC mejoraron 9 de 13 y en el grupo control 2 de 5.

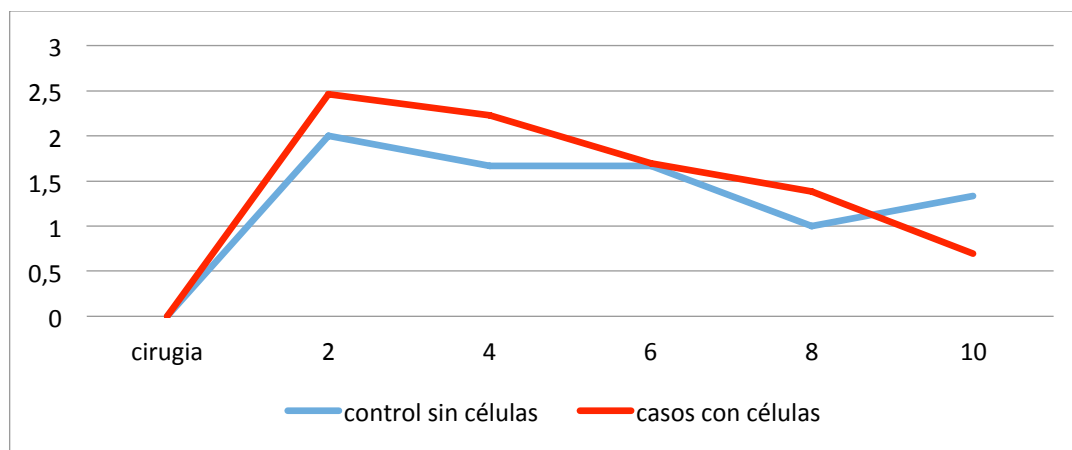


Figura 21. Comparación del estado de isquemia entre casos y controles, con escala cualitativa ordinal. La normalidad está definida por el valor 0.

#### Comparación de medias relativas a clínica isquémica

| Con células | Medias     |                |                                |                 |   |                   |         |
|-------------|------------|----------------|--------------------------------|-----------------|---|-------------------|---------|
|             | Estimación | Error estándar | Intervalo de confianza de 95 % |                 | Prueba de comparación de medias contraste bilateral |                   |         |
|             |            |                | Límite inferior                | Límite superior | Estadístico T                                       | Grado de libertad | Valor p |
| No          | 1,533      | 0,800          | 0,867                          | 1,181           | 0,347   | 9,151             | 0,737   |
| Si          | 1,690      | 1,000          |                                |                 |   |                   |         |

Tabla 25. Comparación de medias independientes relativas a la clínica isquémica ajustada la mortalidad.

|                 | rata | día 2 | día 4 | día 6 | día 8 | día 10 | Mejora=1 |
|-----------------|------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| Control-Sin ASC | 1.6  | 1     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0        |
|                 | 1.9  | 2     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0        |
|                 | 1.12 | 0     | 1     | 0     | 0     | 0      | 1        |
|                 | 1.14 | 1     | 2     | 2     | 2     | 1      | 0        |
|                 | 2.1  | 3     | 2     | 2     | 2     | 2      | 0        |
| Casos-Con ASC   | 1.1  | 1     | 2     | 0     | 1     | 0      | 1        |
|                 | 1.3  | 3     | 2     | 1     | 1     | 1      | 1        |
|                 | 1.4  | 3     | 3     | 1     | 1     | 1      | 1        |
|                 | 1.5  | 2     | 3     | 3     | 3     | 2      | 0        |
|                 | 2.9  | 2     | 3     | 3     | 2     | 1      | 1        |
|                 | 2.12 | 2     | 1     | 3     | 2     | 1      | 1        |
|                 | 3.1  | 2     | 2     | 3     | 2     | 2      | 0        |
|                 | 3.2  | 3     | 4     | 4     | 4     | 4      | 0        |
|                 | 3.4  | 3     | 2     | 1     | 0     | 0      | 1        |
|                 | 3.5  | 3     | 3     | 1     | 1     | 1      | 1        |
|                 | 3.6  | 2     | 2     | 1     | 2     | 2      | 0        |
|                 | 3.7  | 3     | 2     | 1     | 0     | 1      | 1        |
|                 | 3.14 | 3     | 2     | 1     | 1     | 1      | 1        |

Tabla 26. Evolución de la isquemia y valoración final de mejora.

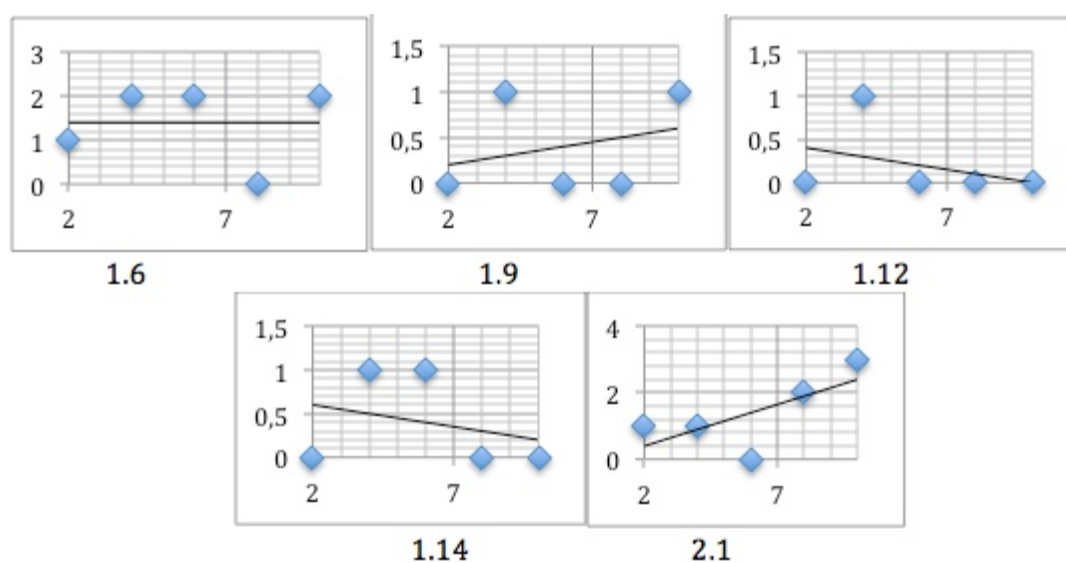


Figura 22. Curvas de evolución clínica isquémica de grupo control.

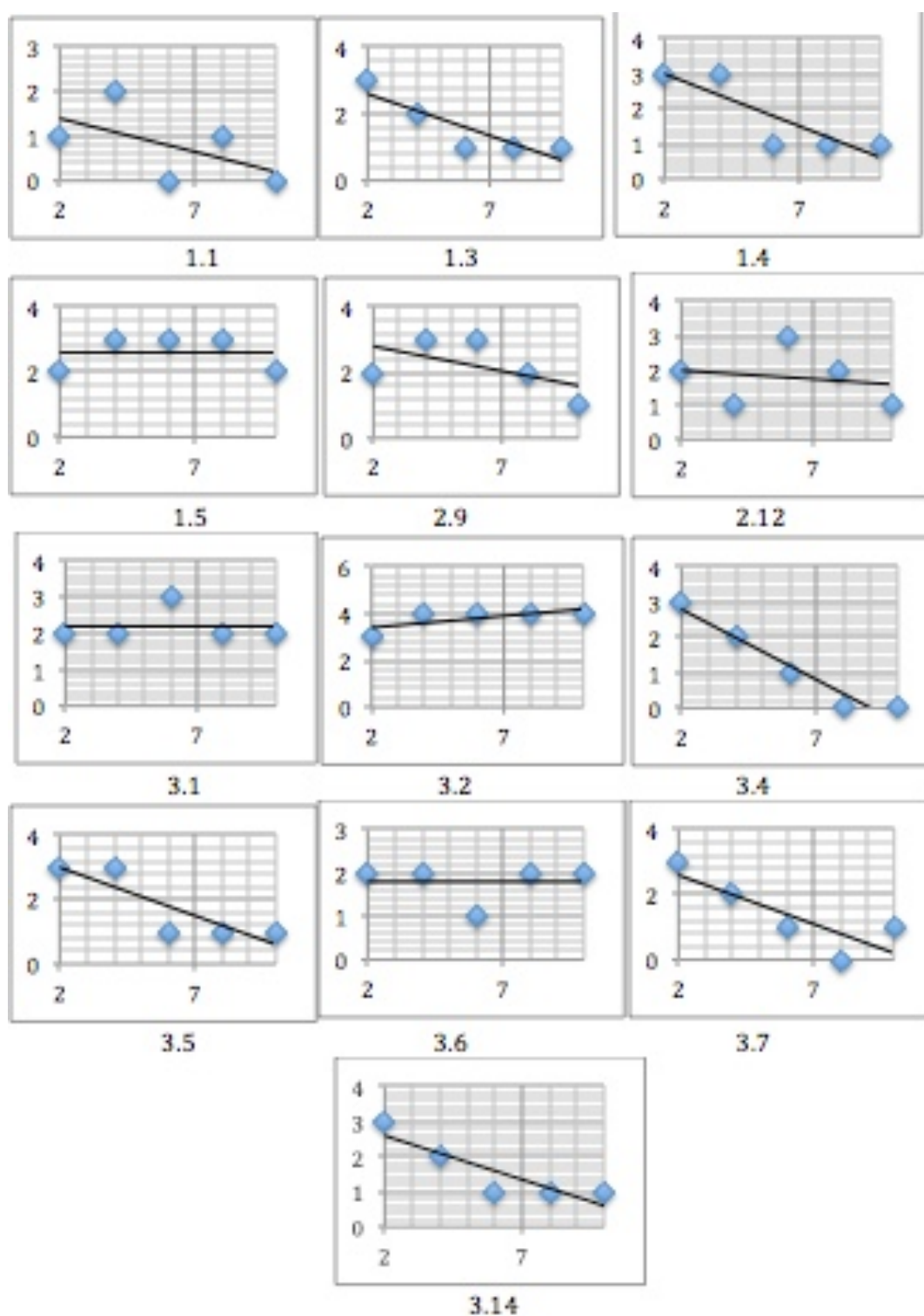


Figura 23. Curvas de evolución clínica isquémica de grupo casos.



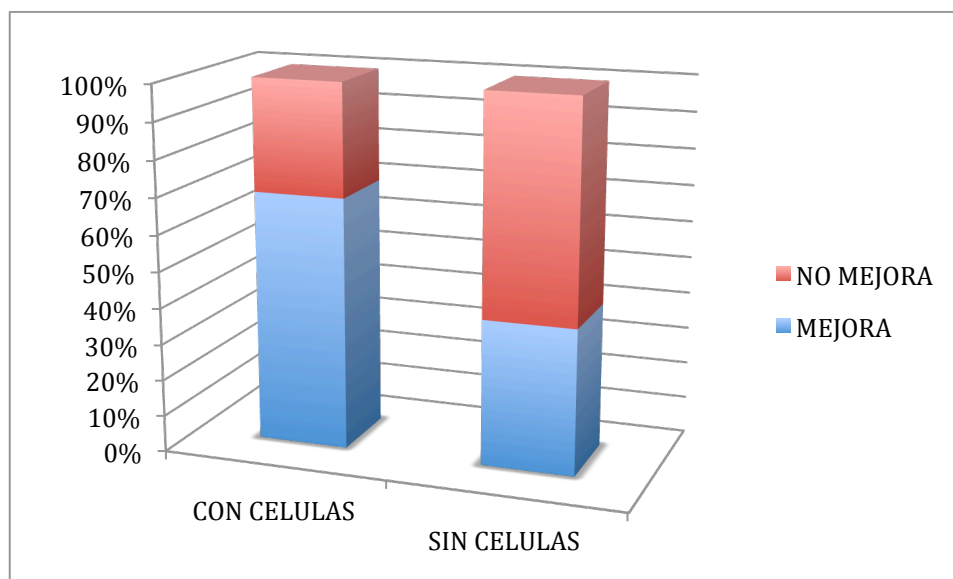


Figura 24. Valores porcentuales de ratas que presentaron mejoría isquémica en relación al tratamiento con ASC o no.

#### Proporciones sobre mejora de clínica general.

| Con células | Proporciones      |                 |            |                                |                 |                            |   |         |
|-------------|-------------------|-----------------|------------|--------------------------------|-----------------|----------------------------|---|---------|
|             | Número de mejoras | Tamaño muestral | Porcentaje | Intervalo de confianza de 95 % |                 |                            | Prueba de comparación de proporciones contraste bilateral |         |
|             |                   |                 |            | Límite inferior                | Límite superior | Diferencia de proporciones | Estadístico Z   | Valor p |
| No          | 2                 | 5               | 40%        | 0,205                          | 0,790           | 0,292                      | 1,139   | 0,255   |
| Si          | 9                 | 13              | 69,231%    |                                |                 |                            |   |         |

Tabla 27. Comparación de proporciones de mejora de clínica isquémica ajustadas a mortalidad.

Resultados histopatológicos.

Tras el estudio de las preparaciones histológicas obtenidas a partir de los cortes transversales de las patas de cada uno de los casos estudiados los resultados fueron los que a continuación se exponen:

Densidad del tejido cicatricial

El tejido fibroso que surge para reparar el tejido isquémico es, en todos los casos del estudio, tejido conjuntivo denso irregular.

En el grupo de seguimiento corto sin ASC, es mas laxo que en el grupo corto con ASC, en el que se puede observar mayor número y densidad de fibras colágenas. En los animales tratados con ASC y que tuvieron un seguimiento de 4 semanas, este tejido conjuntivo es muy tupido formado principalmente por colágeno I.

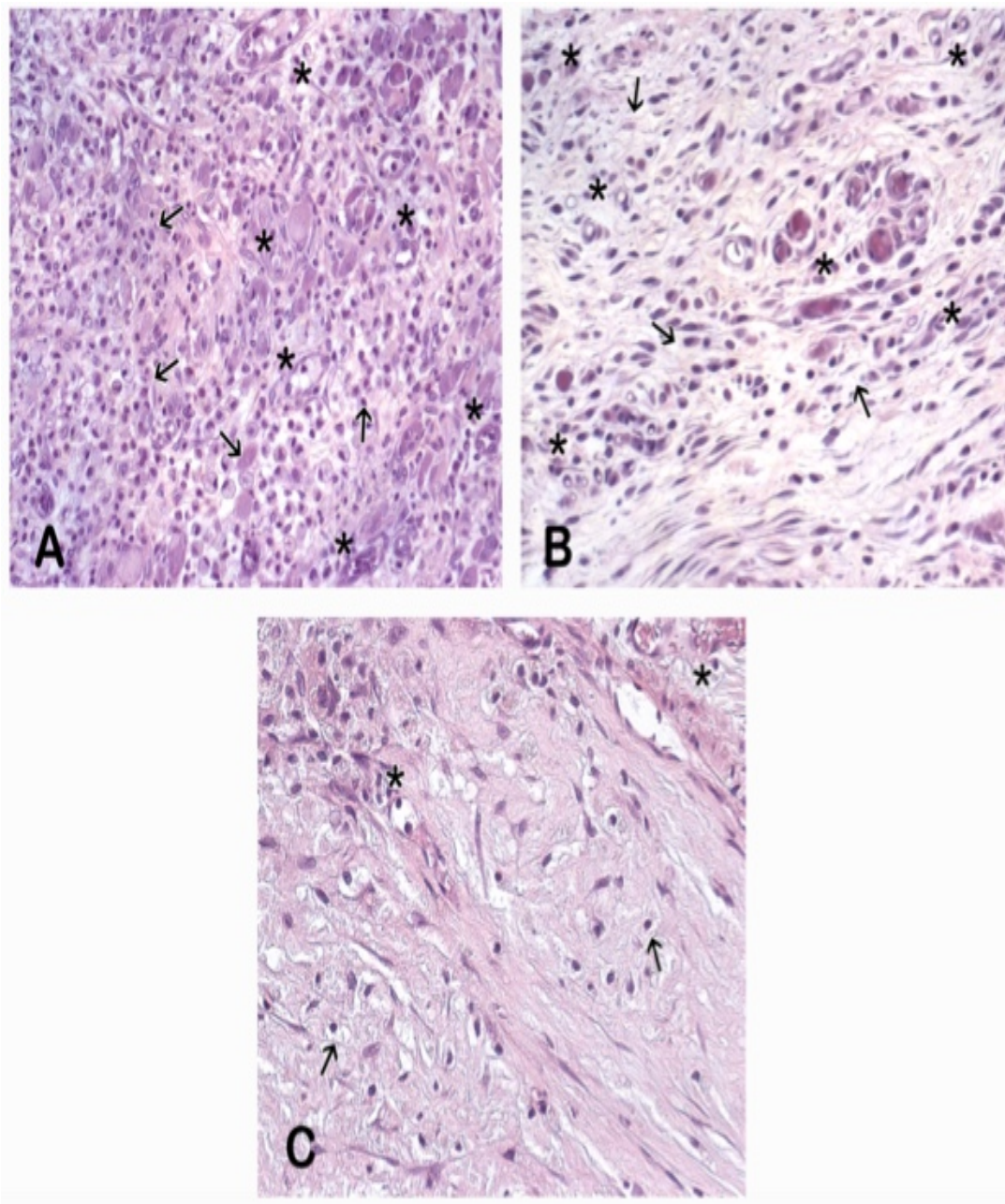


Figura 25. Hematoxilina-eosina de la zona cicatricial a 20 aumentos. Valoración del tejido conjuntivo cicatricial. A. Grupo de seguimiento corto sin ASC. Tejido conjuntivo laxo con gran número de células inflamatorias (flechas). B. Grupo de seguimiento corto con ASC. Tejido conjuntivo laxo con poco infiltrado de células inflamatorias (flechas). C. Grupo de seguimiento largo con ASC. Tejido conjuntivo denso irregular con un mínimo infiltrado inflamatorio (flechas).

### Valoración del grado de infiltración de células inflamatorias

Observamos que en las patas de los animales tratados con ASC hay más mastocitos y macrófagos M2 que en las ratas control y menos cantidad de células plasmáticas, con un infiltrado de neutrófilos y de linfocitos similar.

En el grupo de seguimiento largo las células características de la reacción inflamatoria de los primeros días (neutrófilos y linfocitos) han desaparecido.

|               | NEUTRÓFILOS | LINFOCITOS | CÉLULAS<br>PLASMÁTICAS | MASTOCITOS | MACROFAGOS M2 |
|---------------|-------------|------------|------------------------|------------|---------------|
| Sin ASC corto | 3.18±0.21   | 15.51±0.94 | 17.15±1.70             | 29.25±7.1  | débil         |
| Con ASC corto | 3.55±0.29   | 14.95±0.45 | 13.12±0.49             | 41.75±8.12 | moderada      |
| Con ASC largo | -           | -          | 10.85                  | 10.33      | débil         |

Tabla 28. Recuento del infiltrado inflamatorio de la zona cicatricial en campo de 40 aumentos.

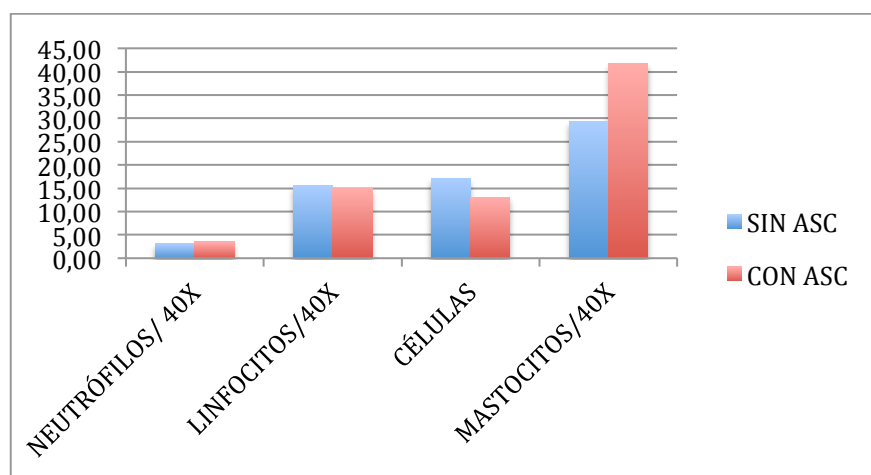


Figura 26. Infiltrado inflamatorio de la zona cicatricial de los grupos cortos en campo de 40 aumentos.

Infiltrado inflamatorio en la región pericicatricial.

Alrededor de la cicatriz que sustituye a la zona de tejido isquémico nos encontramos tejido muscular estriado esquelético que, en todos los casos de seguimiento a corto plazo, se encuentra en buen estado de conservación: las células presentan la forma poligonal característica, los núcleos periféricos y el citoplasma con una la eosinofilia habitual.

En ambos grupos cortos el infiltrado de macrófagos es moderado y se encuentran dispersos entre las fibras musculares. De ellos sólo una parte son M2, localizándose preferentemente alrededor de los paquetes vásculo-nerviosos regionales, incluido en la microglía de los haces nerviosos regionales y el tejido graso de alrededor.

Aunque cuantitativamente la diferencia entre ambos grupos cortos no es estadísticamente significativa, en las patas con células mesenquimales aparecen más macrófagos M2 que en las no tratadas con estas células.

En el grupo de seguimiento largo vuelve a disminuir la presencia de M2 en el tejido.



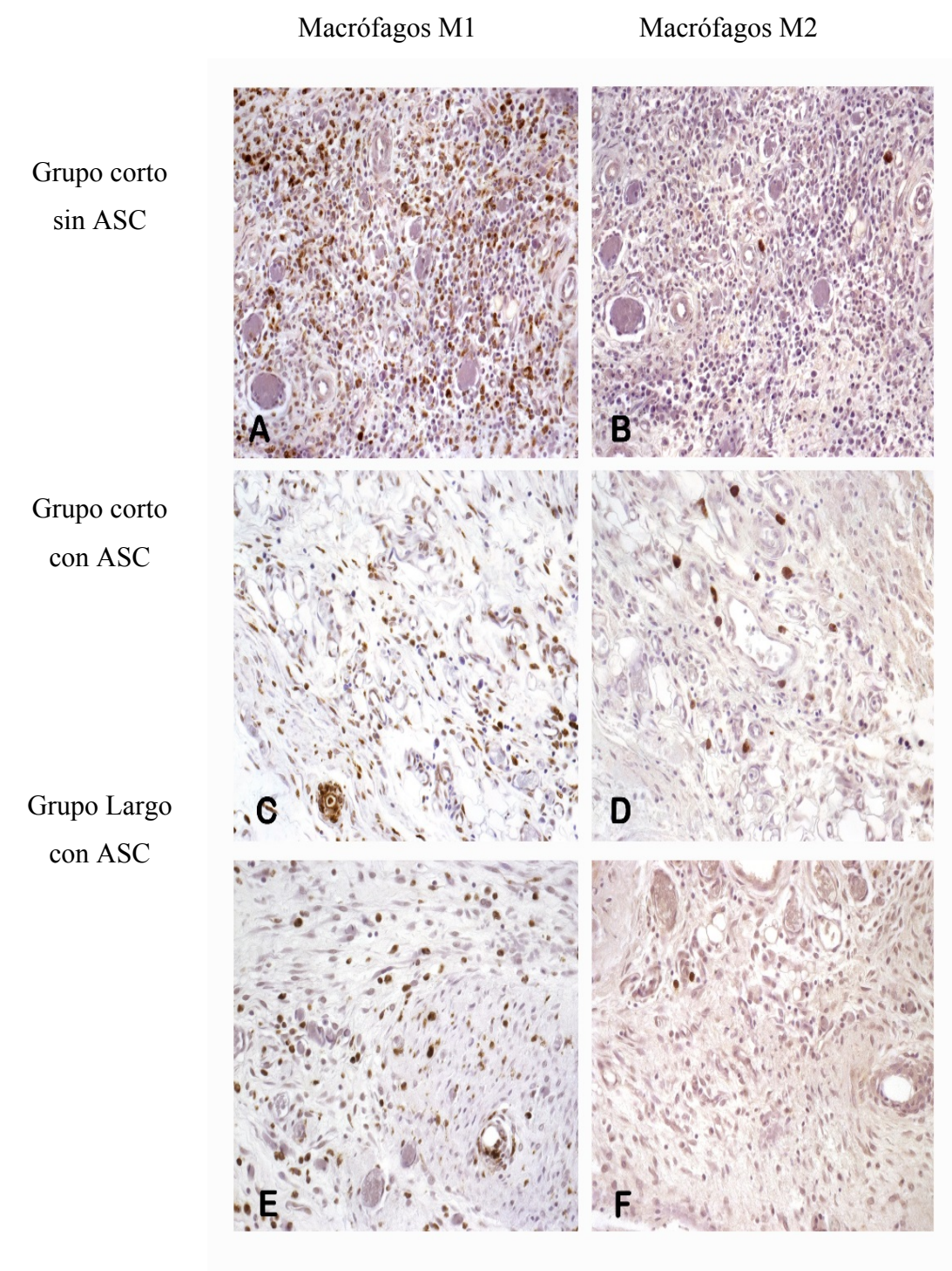


Figura 27. Inmunohistoquímica PAAP anti-CD-68 (macrófagos M1) y anti-CD206 (macrófagos M2) de zona cicatricial, en los que los macrófagos se encuentran marcados con tonos marrones, de los grupos corto sin ASC, corto con ASC y largo con ASC de la zona cicatricial. 20x.

### *Infiltrado inflamatorio en los ganglios linfáticos regionales*

En los ganglios linfáticos regionales hemos valorado a tiempo corto qué proporción de macrófagos M1 y M2 están presentes en cada una de las situaciones del estudio, viendo diferencias significativas entre los grupos:

- En el grupo de seguimiento corto con ASC un 21,37% de los macrófagos son M2.
- En el grupo de seguimiento corto sin ASC un 4,1% de los macrófagos son M2.

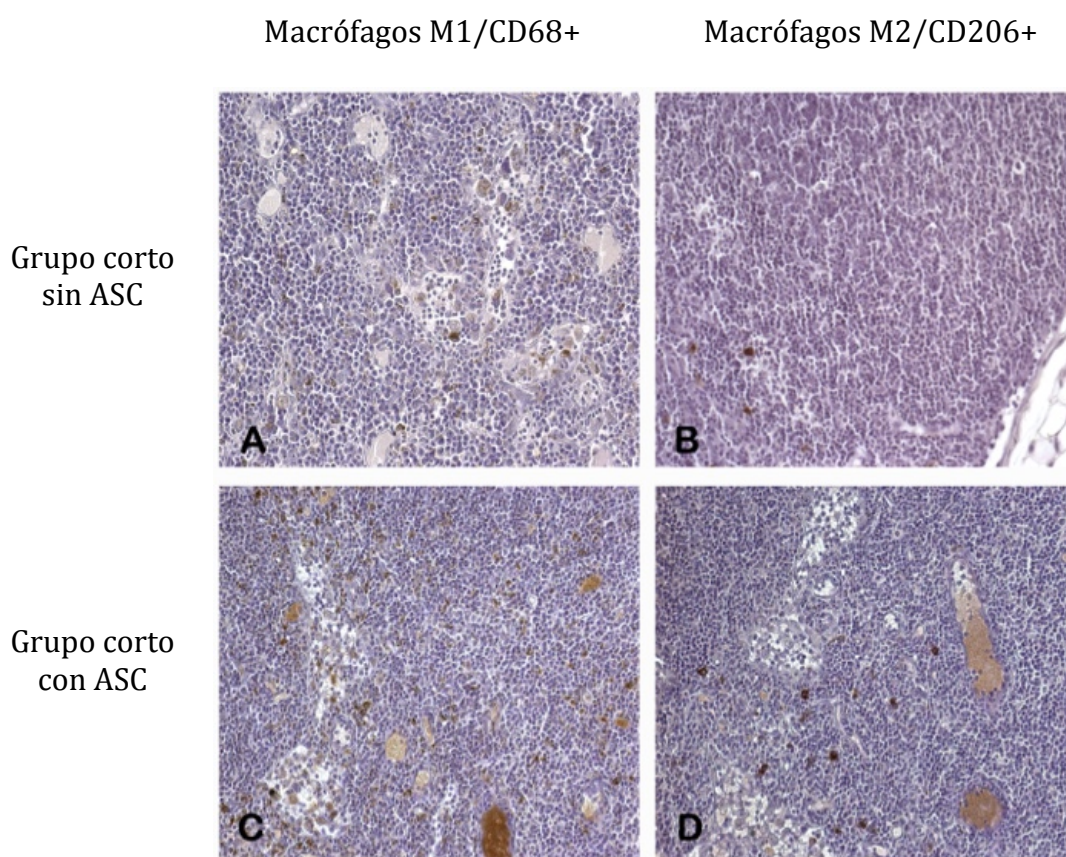


Figura 28. Inmunohistoquímica PAAP anti-CD-68 (macrófagos M1) y anti-CD206 (macrófagos M2) de zona cicatricial, en los que los macrófagos se encuentran marcados con tonos marrones, de los grupos cortos sin ASC y corto con ASC en los ganglios linfáticos regionales. 20x.

## Valoración de la vascularización

### *En la región cicatricial*

Los datos de neovascularización no muestran diferencias significativas tras el recuento histológico de arteriolas y capilares en los diferentes grupos.

### *En la región pericicatricial*

Cuando analizamos la vascularización asociada a las fibras musculares, los capilares, se observa mayor neo-vascularización alrededor de las fibras musculares en el grupo de seguimiento corto con ASC que en las patas de animales sin tratar. Esta vascularización de las patas tratadas se mantiene y estabiliza en el grupo de seguimiento largo (4 semanas) de tratamiento.

|         | NEOVASCULARIZACIÓN REGIÓN<br>CICATRICAL |               | NEOVASCULARIZACIÓN REGIÓN<br>PERICATRICAL |
|---------|---|---------------|---|
|         | ARTERIOLAS/40X                          | CAPILARES/40X | CAPILARES/50 FIBRAS MUSCULARES            |
| SIN ASC | 1.39±0.11                               | 12.29±0.95    | 24  |
| CORTO   |   |               |   |
| CON ASC | 1.19±0.12                               | 7.71±1.29     | 36  |
| CORTO   |   |               |   |
| CON ASC | 2.02                                    | 6.91          | 30  |
| LARGO   |   |               |   |

Tabla 29. Tabla resumen de la neovascularización con recuento de arteriolas, capilares y de capilares por cada 50 fibras musculares.



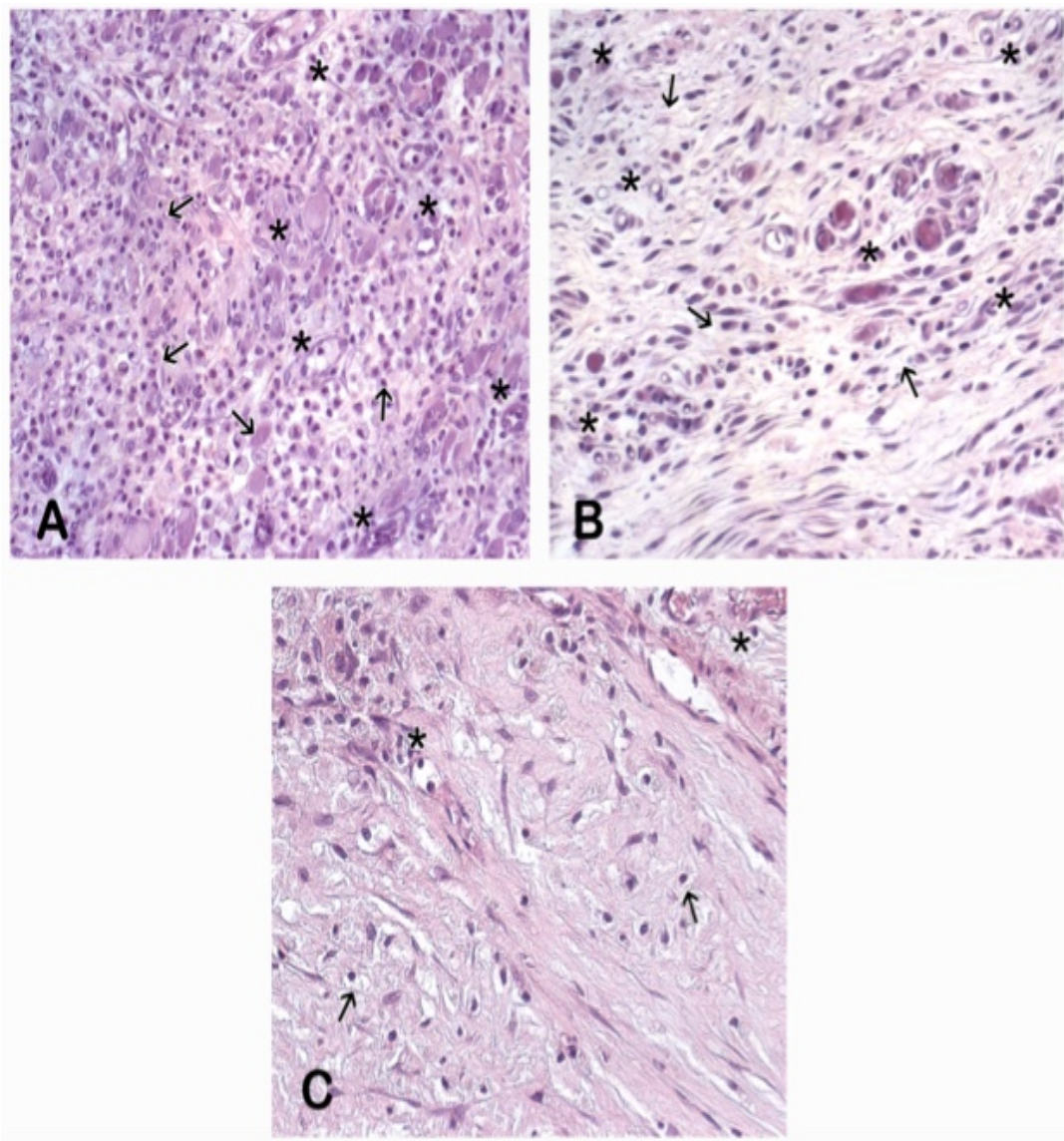


Figura 29. Hematoxilina-eosina de la zona cicatricial- Valoración de la vascularización (Capilares y arteriolas neoformadas (asteriscos)). 20x.

A. Grupo de seguimiento corto sin ASC. Tejido conjuntivo laxo con gran número de células inflamatorias (flechas). B. Grupo de seguimiento corto con ASC.

## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

### ***5.1 INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA EN LA DIABETES Y EL POR QUÉ DEL USO DE CÉLULAS ASCS***

La Diabetes Mellitus es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (133) y la enfermedad cardiovascular es la causa principal de muerte en los pacientes diabéticos, provocando hasta 50% de las muertes entre ellos (134). En un contexto mundial en el que el número de pacientes diabéticos está en aumento, con una expectativa de crecimiento de hasta 366 millones de enfermos en 2030 (161), la enfermedad cardiovascular en ellos se convierte en un problema de salud mundial emergente.

La isquemia arterial crónica, afecta al 4.3% de la población, alcanzando cifras dentro del subgrupo diabético de hasta el 7,5% entre los 60 y 64 años (1,11,135).

El tratamiento actual de esta entidad es la revascularización, ya sea a través de cirugía “abierta” (*bypass*, derivaciones, plastias y endarterectomías) o procedimientos endovasculares (angioplastias y *stenting*). No obstante, en determinados pacientes estas técnicas no son efectivas o no se pueden realizar, ya sea por las características anatómicas y morfológicas de las lesiones o las del paciente, por lo que para el tratamiento del dolor y de las lesiones tróficas, debemos utilizar la última opción posible, la amputación, que conlleva una agresión grave al paciente, con una alta morbilidad postoperatoria, un deterioro severo de la calidad de vida y un alto gasto sanitario (136–138).

La angiogénesis terapéutica puede ser en estos casos “irrevascularizables” una estrategia útil cuyo objetivo es la proliferación de vasos colaterales. Se han descrito numerosas moléculas angiogénicas, tanto en modelos animales como en humanos con enfermedades isquémicas (103,108,139–145,162).

La utilización de células troncales mesenquimales está ganando importancia en la terapia celular para la regeneración vascular de enfermedades isquémicas.

Las ASCs son células multipotentes, de rápida y fácil proliferación, que, de forma autóloga, se han mostrado seguras, tanto en ensayos experimentales como en ensayos clínicos en Fases I y IIa, para el tratamiento de enfermedades isquémicas (163).

Las ASCs también secretan factores angiogénicos y de supervivencia celular y han demostrado ser efectivas para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular isquémica y complicaciones de la diabetes en modelos animales y en humanos (104,108,144–146).

Las ASCs presentan un perfil inmunológico privilegiado al no presentar HLA II y una expresión de HLA I muy limitada, que las harían aptas como alternativa al tratamiento autólogo.

No obstante se conoce poco sobre cómo influyen la arteriosclerosis y la diabetes sobre las ASCs. Estudios realizados sobre células derivadas de pacientes diabéticos han demostrado que son defectuosas en sus propiedades angiogénicas y son inefectivas para el tratamiento de la enfermedad isquémica (155–158).

Por otra parte, el tratamiento con células autólogas precisa tiempo para la extracción, desdiferenciación, multiplicación y posterior aplicación. En ocasiones no se dispone de este tiempo por la rápida evolución de la isquemia crítica. Este problema podría solucionarse con una estrategia de terapia alogénica.

## ***5.2 ELECCIÓN DEL ANIMAL DE ESTUDIO***

La diabetes es una enfermedad heterogénea, de gran incidencia y que produce múltiples complicaciones en diferentes órganos. Esto provoca que sea difícil obtener un modelo animal que abarque todas las variedades de diabetes y sus complicaciones. Además hay que considerar que son pocos los animales en los que se haya estudiado esta enfermedad en profundidad.

Los costos relativamente bajos y su fácil reproducción, hacen que los roedores sean especialmente útiles (74–77).

En este experimento, cuyo protocolo contaba con dos circunstancias de gran importancia por su morbi-mortalidad, como son la inducción diabética y una cirugía isquemizante con apertura del abdomen, hemos querido minimizar en la medida de lo posible el resto de las variables, por lo que se seleccionaron individuos jóvenes, con pesos entre 150-200 g, de 8 a 10 semanas de edad, de género masculino de la raza Sprague-Dawley, ampliamente utilizados para este tipo de proyectos, y con importante sensibilidad a la diabetogénesis por estreptozotocina.

Aunque se podrían haber escogido otros animales como los ratones, éstos se descartaron por presentar una gran variabilidad en su

vascularización. Esta variabilidad es un factor a tener en cuenta a la hora de valorar los resultados obtenidos en los estudios de isquemia y angiogénesis, y así está descrito (164).

Las ratas modificadas genéticamente podrían haber sido un mejor modelo diabético, aunque el precio de cada espécimen imposibilitó su uso en este estudio.

### ***5.3 EL MODELO DE DIABETES***

En este experimento se ha abogado por un modelo de inducción química con estreptozotocina. Éste presenta muchas ventajas, razón por la cuál es el más ampliamente utilizado.

La estreptozotocina es un agente alquilante de gran estabilidad y un análogo tóxico de la glucosa. Su mecanismo de acción es selectivo de las células beta del páncreas y presenta poca afinidad por el transportador de glucosa GLUT2. Una vez es transportado al interior de la célula, la estreptozotocina agrega grupos metilo a la guanina del ADN nuclear y del ADN mitocondrial, actuando también de forma directa sobre las proteínas. Esto genera una alteración en el metabolismo de los carbohidratos y finalmente la necrosis celular. Este mecanismo puede generar una necrosis masiva de las células beta pancreáticas, produciendo una liberación repentina de insulina y una hipoglucemia letal en las primeras 48 horas. Es por esta razón que se les da agua azucarada los primeros 2 días.

No obstante, también presenta inconvenientes. Una de las principales desventajas es su delicado equilibrio entre la efectividad diabetogénica y

la mortalidad. La mortalidad no debe superar el 20%, mientras que el 80% de los supervivientes debe superar los criterios de diabetes (165). Esto hace que pequeñas variaciones en la dosis administrada puedan ocasionar desde una diabetes no estable hasta la muerte, como se objetivó en la fase de puesta a punto o pre-experimental. Aunque no solo depende de la dosis administrada, los efectos de este medicamento varían en gran medida dependiendo de las características del espécimen, existiendo una gran variación en función del estado nutricional, la edad, el género y de la especie y linaje del animal (78).

Otras desventajas que presenta este fármaco es que la diabetes inducida por estreptozotocina puede no ser estable, e incluso su efecto puede ser reversible. También puede alterar el metabolismo del glucógeno a nivel renal, produciendo glucosuria y acetonuria, y a medio plazo puede producir tumores renales (166,167).

No obstante, tanto el aloxano, que genera una diabetes aún menos predecible, como los métodos quirúrgicos nos parecen modelos menos aptos. En todo caso, los modelos genéticos, pueden ser más recomendables para este tipo de estudio por disminuir el número de especímenes y aumentar la homogeneidad, aunque son costosos.

El uso de un modelo de inducción química, con estreptozotocina o aloxano, ha demostrado ser inferior en hembras, por lo que se escogieron machos. Al rechazar a las hembras se evita el efecto del estradiol, que tiene un papel protector contra la diabetes inducida químicamente (84) al influir sobre el metabolismo de la glucosa.

Así mismo tampoco se escogió un individuo hembra para la obtención de ASC, ya que se ha visto que el estradiol tiene un papel sobre la multi-diferenciación de las ASC “in vitro” (168,169).

Durante la puesta a punto identificamos algún problema derivado de la propia inducción diabética, como la poliuria que se presentó en varias ocasiones y que condicionó una deshidratación de los especímenes y un empeoramiento en las condiciones higiénicas del enjaulamiento, precisando un cambio más frecuente de la viruta.

#### ***5.4 EL MODELO DE ISQUEMIA.***

Se escogió un modelo agresivo de isquemia, porque los modelos de isquemia más crónicos, como la provocación de una isquemia mantenida y exacerbada mediante un constrictor (114), o menos invasivos, como la ligadura aislada de la arteria femoral (110), eran menos apropiados para este estudio.

El modelo con constrictor, quizás el que más se aproxima a la cronicidad de la isquemia crónica, no fue utilizado por elevar los costes que suponía este dispositivo, por predisponer a la infección, y por prolongar los tiempos para provocar una isquemia clínica.

La ligadura exclusiva del paquete femoral, que presenta como ventaja el no precisar la apertura de la cavidad abdominal y por tanto tiene menos complicaciones, tiene el inconveniente que objetivamos en la puesta a punto de no generar una isquemia clínicamente relevante. Probablemente esto se deba a la gran colateralidad y variabilidad que los roedores



presentan a través de las arterias mamarias, como está descrito en los ratones (164).

En lo referente al modelo finalmente utilizado, se eligió el lado izquierdo por estar más accesible a nivel iliaco, asociando la ligadura y sección de la arteria femoral en bloque, y de sus ramas tributarias a nivel inguinal.

### ***5.5 SOBRE LOS RESULTADOS DE LA INDUCCIÓN DIABÉTICA.***

La inducción diabética con una concentración de 0,65mg/kg tuvo una eficacia del 72%, en el grupo de seguimiento a largo plazo y un 80% en el grupo de seguimiento corto. La mortalidad atribuible a la inducción diabética fue del 0,06%, con sólo 3 exitus en el grupo corto. Estos datos se corresponden con la literatura (165), aunque los artículos consultados suelen obviar el porcentaje de diabetogénesis y de mortalidad atribuibles a la estreptozotocina.

Como se ha comentado previamente, el modelo con estreptozotocina es un modelo complejo que simula una diabetes insulín dependiente, que puede lesionar diferentes órganos diana y que puede producir una hiperinsulinemia en los primeros días por una necrosis masiva de las células beta pancreáticas y una posterior hipoglucemia que puede ser letal.

Probablemente la imposición de una tasa de glucemia techo a partir de la cuál descartar las ratas podría solventar la mortalidad posterior y dar muestras más homogéneas. No obstante no hemos encontrado literatura que oriente sobre dicho valor techo (170).

## **5.6 SUPERVIVENCIA**

En el grupo de seguimiento largo se objetivó una supervivencia acumulada del 80% a los dos días, y una supervivencia total del 50% a los 30 días.

Estos resultados pueden deberse a la hiperglucemia secundaria a la inducción con estreptozotocina o a sus complicaciones, ya que todas las ratas que se perdieron presentaban las glucemias más altas (4 de ellas tenían glucemias superiores a 600 mg/dl y otra de 482), aunque es cierto que dos de ellas tuvieron que ser sacrificadas por presentar una isquemia muy severa de la extremidad.

Debido al pequeño tamaño muestral no podemos asegurar que la glucemia fuera un factor determinante en la supervivencia y por lo tanto de confusión de los efectos de las ASCs sobre la isquemia, aunque parece lógico pensar que los individuos más enfermos tengan una curva de crecimiento menor, como se vio en el estudio observacional a largo plazo y una menor supervivencia.

En el grupo de seguimiento a corto plazo se comprobó una mejoría en la supervivencia de forma significativa en las ratas tratadas con ASCs, siendo ambos grupos comparables en peso y glucemia tras la inducción diabética.

### ***5.7 SOBRE LOS EFECTOS CLÍNICOS (ESTADO GENERAL E ISQUEMIA)***

La creación de una tabla que pusiese de manifiesto el estado general y la isquemia fue una labor compleja. Por una parte precisa entrenamiento por parte del observador para hacer una valoración lo más objetiva posible de los comportamientos que adquiere un animal que está sufriendo. Por otra parte la isquemia puede afectar al estado general, por lo que en ocasiones podían superponerse las apreciaciones. Consideramos que la opción que utilizamos finalmente, con dos escalas diferentes, es una estrategia que garantiza evitar sufrimientos al animal.

En el grupo de seguimiento a largo plazo se comprobó que tanto el estado general como la isquemia, presentaban una paulatina mejoría de las ratas supervivientes, alcanzando prácticamente la normalidad al final del seguimiento (puntuación media para isquemia y estado general de 0,25 respectivamente) lo que nos puede orientar sobre el efecto de las células troncales, a nivel local y global en los individuos.

En el grupo de seguimiento a corto plazo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el estado general, mientras que en la clínica isquémica no se observaron diferencias.

En lo referente a la isquemia, los valores fueron muy similares, aunque hay que reseñar que el grupo tratado inició la experiencia con una peor clínica y terminó con mejores resultados que el grupo control.

## **5.8 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS**

### **Densidad del tejido cicatricial**

Desde un punto de vista mecánico, con la inyección de las ASC en las zonas isquémica hemos conseguido crear una cicatriz más resistente ya que es un tejido conjuntivo denso, poco vascularizado y con poco infiltrado inflamatorio, mientras que los animales no tratados presentaron un tejido conjuntivo mas laxo y con una mayor cantidad de capilares; esta mayor irrigación sanguínea, que desde un punto de vista fisiológico podríamos pensar que es beneficiosa, perjudica la estabilidad mecánica ya que debilita el tejido conjuntivo. En el grupo a largo plazo este tejido conjuntivo fue, si cabe, aún más tupido y con más fibras de colágeno

### **Infiltrado inflamatorio**

Se evidenció una reacción inflamatoria aguda de neutrófilos y linfocitos similar en ambos grupos. No obstante en el grupo tratado con ASCs, se pudo observar una disminución de células plasmáticas (células de gran importancia en la fase crónica de la inflamación), un aumento en el recuento de los mastocitos y una mayor concentración de macrófagos. Estos hallazgos nos orientan hacia la idea de que las ASCs pueden influir en la inmunomodulación y recortar la evolución temporal de la inflamación.

Al aplicar ASCs sobre la cicatrización de un tejido isquémico los macrófagos M2 adquieren una gran importancia. Las ASC ejercen una estimulación directa sobre la conversión de los M1 a este otro fenotipo macrofágico por la secreción de IL, principalmente la IL-10, lo que

podría favorecer la reparación del tejido cicatricial (171). Hemos querido conocer este efecto en ratas diabéticas valorando semicuantitativamente su presencia.

A los diez días encontramos que las ASC ya han conseguido estimular la presencia de los M2 en los ganglios linfáticos regionales, en el tejido cicatricial y en el peri-cicatricial. Tras 4 semanas de evolución, la presencia de macrófagos M2 sigue siendo mayor que la de macrófagos M1.

En los grupos de seguimiento a corto plazo (10 días post-isquemia) a los que se les ha aplicado ASCs , hay cerca de un 47% más de mastocitos que en los que no las hemos aplicado.

Las ASCs secretan IL-3, IL-4 e IL-10, que son factores quimiotácticos que hacen que los macrófagos atraídos al foco lesionado se diferencien a M2 (anti-inflamatorios y pro-regeneradores del tejido). Estos M2, que a su vez sintetizan y secretan grandes cantidades de IL-10, también son los responsables del aumento de la concentración de mastocitos en el foco tisular en reparación; todo el conjunto celular y el microambiente que crean tienen el beneficioso efecto de aumentar el número de capilares por célula muscular en las regiones pericatriciales.

### **Vascularización**

La zona pericicatricial de los animales tratados con ASCs presentaba tejido muscular esquelético más vascularizado, con una mayor cantidad de capilares por fibra. Esta vascularización es un factor que favorece la correcta función de las fibras musculares y por tanto mejor recuperación de la movilidad de la extremidad.

En conjunto la aplicación de ASCs presenta una mejoría en la cicatrización con un tejido conjuntivo estructuralmente resistente, un menor infiltrado inflamatorio, con una reducción de la fase aguda en pro de una mayor reparación tisular y un estado proangiogénico debido a las células implicadas que explicaría una mayor vascularización de las fibras musculares. Esta situación, consideramos que se debe al control inflamatorio e inmunológico generado por las ASC pero son necesarias investigaciones para aclarar los mecanismos exactos.

### ***5.9 CONSIDERACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES***

Planteamos como líneas de investigación futuras las siguientes ideas:

- Una mejor estandarización de los valores de glucemia para evitar pérdidas que puedan modificar los datos sobre la angiogénesis.
- Para una mejor determinación del papel de las ASCs alogénicas en modelos isquémicos y diabéticos creemos preciso:
  - Aumentar el tamaño muestral y periodos de seguimiento
  - Realización de comparativas entre:
    - Ratas isquémicas no diabéticas con ASC
    - Ratas isquémicas diabéticas con ASC
    - Ratas isquémicas diabéticas sin ASC

# **RESUMEN**

## 6. RESUMEN

### Introducción:

La diabetes es uno de los principales factores de riesgo de la arteriopatía periférica. En pacientes en los que no se puede realizar cirugía, la terapia celular puede ser un tratamiento alternativo. Teniendo en cuenta que el tiempo es fundamental, proponemos el uso de células mesenquimales alogénicas, para el tratamiento de la isquemia en un modelo diabético murino.

### Material y método:

Se obtuvieron células mesenquimales derivadas de la grasa de una rata Sprague-Dawley sana. Tras inducción diabética con estreptozotocina en 54 ratas Sprague-Dawley machos, se realizó ligadura y sección de arteria iliaca y femoral izquierdas, como modelo de isquemia. 14 ratas fueron tratadas con células mesenquimales y se siguieron durante 28 días registrando en nuestra escala clínica variables de clínica general y de isquemia. De las 40 ratas restantes, se inocularon  $10^6$  células mesenquimales a 17 de ellas, 12 se consideraron controles y 11 fueron pérdidas. Los grupos caso y control se siguieron durante 10 días. Tras completar el seguimiento se hizo un análisis macroscópico e histopatológico, estudiándose la reparación del miembro lesionado, el grado de angiogénesis y el grado de infiltración inflamatoria. Todas las muestras fueron valoradas por el mismo investigador de forma ciega.

### Resultados:

Las ratas tratadas con células presentaron mejor estado general, mayor tendencia a la angiogénesis, mayor infiltrado de macrófagos M2 y un



acortamiento del proceso inflamatorio. Se obtuvo diferencia significativa en la supervivencia, mejoría clínica general y en las variables inflamatorias. No se observó reacción inmunológica por el uso de células alogénicas.

Discusión:

La aplicación de ASCs alogénicas en un modelo murino y diabético de isquemia de extremidad consigue una disminución de los parámetros inflamatorios a favor de una mejor reparación del tejido dañado.

## **CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

1. El modelo experimental ha demostrado ser eficaz al provocar una diabetes e isquemia reproducibles, a pesar de lo agresivo de la cirugía a nivel iliaco y de la ausencia de un umbral máximo de glucemia que sirva para una mejor estandarización.
2. El tratamiento con ASCs de forma alogénica para el tratamiento de la isquemia de un modelo diabético murino mejora la supervivencia.
3. El tratamiento con ASCs muestra una tendencia hacia la mejora de la clínica isquémica y del estado general, aunque en este experimento no ha habido diferencias estadísticamente significativas.
4. Las ASCs consiguen una mejoría en la reparación del tejido dañado, con un tejido más fibroso en la cicatriz, menor grado de reacción inflamatoria, con más mastocitos y macrófagos M2, y mejor neovascularización en el tejido muscular esquelético adyacente.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Sur. *Circulation* . 2006 Mar 21;113 (11):e463-654.
2. Gardner AW, Montgomery PS, Parker DE. Optimal exercise program length for patients with claudication. *J Vasc Surg* . 2012 May;55 (5):1346–54.
3. Berenson G, Srinivasan S. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *New Engl J*. 1998 Jun 4;338 (23):1650-6
4. McGill H, McMahan C, Gidding S. Preventing heart disease in the 21st century implications of the pathobiological determinants of atherosclerosis in youth (PDAY) study. *Circulation*. 2008 Mar 4;117 (9):1216-27.
5. Pedersen T, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival. *Lancet*. 1994 Nov 19;344 (8934):1383-9.
6. Epstein F, Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340 (2):115-26.
7. Benditt E, Benditt J. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques. *Proc Natl*. 1973 Jun;70 (6):1753-6.
8. Flavahan N. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDRF/nitric oxide activity. *Circulation* . 1992 May;85 (5):1927-38.
9. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995 ;57:791-804.

10. Berliner J, Navab M, Fogelman A. Atherosclerosis: basic mechanisms oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* . 1995 May 1;91 (9):2488-96.
11. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FGR, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* . 2007 Jan;33 Suppl 1:S1-75.
12. Spronk S, Bosch JL, Veen HF, den Hoed PT, Hunink MGM. Intermittent claudication: functional capacity and quality of life after exercise training or percutaneous transluminal angioplasty-systematic review. *Radiology* . 2005 Jun;235 (3):833–42.
13. Warburton DER, Nicol CW, Bredin SSD. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ* . 2006 Mar 14;174 (6):801–9.
14. Ben-Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N, Harel-Adar T, Feinberg MS, Abd Elrahman I, et al. Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* . 2013 Nov 12;62 (20):1890–901.
15. Chiossone L, Conte R, Spaggiari GM, Serra M, Romei C, Bellora F, et al. Mesenchymal Stromal Cells Induce Peculiar Alternatively Activated Macrophages Capable of Dampening Both Innate and Adaptive Immune Responses. *Stem Cells* . 2016 Jul;34 (7):1909–21.
16. Sawatsubashi M, Yamada T, Fukushima N, Mizokami H, Tokunaga O, Shin T. Association of vascular endothelial growth factor and mast cells with angiogenesis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* . 2000 Mar;436 (3):243–8.
17. Tajima H, Iwai-Takano M, Yaoita H, Ogawa K, Yamaki T, Takeishi Y, et al. Mast cells contribute to flow restoration by bone marrow cell transplantation in rats with ischemic limbs. *Int Heart J* . 2009 Mar;50 (2):247–57.
18. Sierralta L. Análisis bioético de las terapias neurodegenerativas basadas en el uso de células madre. 2011
19. Konstantinov I. In search of Alexander A. Maximow: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect Biol Med* . 2000 Winter;43 (2):269-76.

20. Craig J, Turner M, Parker A. Peripheral blood stem cell transplantation. *Blood Rev* . 1992 Jun;6 (2):59-67.
21. Becker A, McCulloch E, Till J. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. 1963 Feb 2;197:452-4
22. Blau H, Brazelton T, Weimann J. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* . 2001 Jun 29;105 (7):829-41.
23. Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* . 1981 Jul 9;292 (5819):154-6.
24. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad*. 1981 Dec;78 (12):7634-8.
25. Doetsch F, Caille I, Lim D. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* . 1999 Jun 11;97 (6):703-16.
26. Qu-Petersen Z, Deasy B. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice potential for muscle regeneration. *J cell*. 2002 May 27;157 (5):851-64.
27. Seale P, Rudnicki M. A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells. *Dev Biol* . 2000 Feb 15;218 (2):115-24.
28. Janes S, Lowell S, Hutter C. Epidermal stem cells. *J Pathol* . 2002 Jul;197 (4):479-91.
29. Beltrami A, Barlucchi L, Torella D, Baker M. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* . 2003 Sep 19;114 (6):763-76.
30. Puglisi M, Giuliani L, Fierabracci A. Identification and characterization of a novel expandable adult stem/progenitor cell population in the human exocrine pancreas. *J Endocrinol* . 2008 Jun;31 (6):563-72.
31. Marshman E, Booth C, Potten C. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* . 2002 Jan;24 (1):91-8.
32. Strain A, Crosby H. Hepatic stem cells. *Gut* . 2000 Jun;46 (6):743-5.
33. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res*. 2000 Apr 13;270 (2):517-21.

34. Yen B, Huang H, Chien C, Jui H. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem*. 2005;23 (1):3-9.
35. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* . 2001 Apr;7 (2):211–28.
36. Grinnemo K-H, Sylvén C, Hovatta O, Dellgren G, Corbascio M. Immunogenicity of human embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* . 2008 Jan; 331 (1):67–78.
37. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res* . 2008 Jan;100:133–58.
38. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126 (4):663-76.
39. Yu J, Vodyanik M. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318 (5858):1917-20
40. Weissman I. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100 (1):157-68.
41. Wagers A, Weissman I. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116 (5):639-48.
42. Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* . 2009 Jan;217 (2):282–98.
43. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*. 2009 Apr;76 (2):56-66.
44. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* . 2007 Apr;25 (4):818–27.
45. De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* . 2001 Aug;44 (8):1928–42.
46. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res* . 2007 Apr 5;100 (9):1249–60.



47. Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regen Med* . 2012 Mar;7 (2):225–35.
48. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* . 2012 May;30 (5): 804–10.
49. Badimon L, Oñate B, Vilahur G. Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y su potencial reparador en la enfermedad isquémica coronaria. *Rev Española Cardiol*. 2015 Jul;68 (7):599-611.
50. Villaret A, Galitzky J, Decaunes P, Estève D, Marques M-A, Sengenès C, et al. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes*. 2010 Nov;59 (11):2755–63.
51. Shepherd PR, Gnudi L, Tozzo E, Yang H, Leach F, Kahn BB. Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J Biol Chem* . 1993 Oct 25;268 (30):22243–6.
52. Perrini S, Laviola L, Cignarelli A, Melchiorre M, De Stefano F, Caccioppoli C, et al. Fat depot-related differences in gene expression, adiponectin secretion, and insulin action and signalling in human adipocytes differentiated in vitro from precursor stromal cells. *Diabetologia* . 2008 Jan;51 (1):155–64.
53. Tchkonina T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, et al. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes* . 2006 Sep;55 (9):2571–8.
54. Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* . 2004 May;53 (5):632–7.
55. Tchkonina T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, et al. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* . 2007 Jan;292 (1):E298-307.

56. Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2006 Apr 25;103 (17):6676–81.
57. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* . 2006 Jan;8 (4):315–7.
58. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* . 2007 Nov 30;131 (5):861–72.
59. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010 Jun;5 (2):103–10.
60. Wang M, Crisostomo PR, Herring C, Meldrum KK, Meldrum DR. Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* . 2006 Oct;291 (4):R880-4.
61. Carrozza J, Kuntz R. Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann Intern*. 1993 Mar 1;118 (5):344-9.
62. Tamaki T, Akatsuka A, Ando K, Nakamura Y, Matsuzawa H, Hotta T, et al. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* . 2002 May 13;157 (4):571–7.
63. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* . 1999 Apr;5 (4):434–8.
64. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* . 2000 Sep;6 (9):1004–10.

65. Fadini GP, Sartore S, Albiero M, Baesso I, Murphy E, Menegolo M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2006 Sep;26 (9): 2140–6.
66. Ii M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, et al. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* . 2006 Mar 17;98 (5): 697–704.
67. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* . 2004 Mar 16;109 (10):1292–8.
68. Sprengers RW, Lips DJ, Moll FL, Verhaar MC. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. *Ann Surg* . 2008 Mar;247 (3):411–20.
69. Arias-Díaz J, Balibrea J. [Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes]. *Nutr Hosp*;22 (2):160–8.
70. Camaud C. The contribution of animal models to the understanding of the pathogenesis of type I diabetes. *Brazilian J Med & Biological Res*. 1995 Jul 8;12:98.
71. Verspohl E. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med*. 2002 Jul;68 (7):581-90.
72. Rees D, Alcolado J. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005 Apr;22 (4):359-70.
73. Huisamen B. Protein kinase B in the diabetic heart. *Biochem Diabetes Atheroscler*. 2003 Jul;249 (1-2):31-8.
74. Rodríguez H, Méndez J. Diabetes mellitus experimental. *Cienc Vet México-DF* . 1994;6:347-7.
75. Jonasson O, Jones CW, Bauman A, John E, Manaligod J, Tso MO. The pathophysiology of experimental insulin-deficient diabetes in the monkey. Implications for pancreatic transplantation. *Ann Surg* . 1985 Jan;201 (1):27–39.
76. Hatchell DL, Reiser HJ, Bresnahan JF, Whitworth UG. Resistance of cats to the diabetogenic effect of alloxan. *Lab Anim Sci* . 1986 Feb;36 (1):37–40.

77. Goldner M, Gomori G. Alloxan diabetes in the dog. *Endocrinology* . 1943 Nov; 33 (5): 297-308.
78. Hugués Hernandorena B, Rodríguez García JC, Rodríguez González JC, Marrero Rodríguez MT. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Cuba Endocrinol* . 1999, Editorial Ciencias Médicas;13 (2).
79. Reifsnnyder PC, Churchill G, Leiter EH. Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice. *Genome Res* . 2000 Oct;10 (10):1568–78.
80. Stauffacher W, Kikkawa R. Hereditary hyperglycemic syndromes in laboratory rodents. En *The genetics of diabetes mellitus*. Springer Berlin Heidelberg, 1976. p. 155-164.
81. Gerritsen G, Blanks M. Environmental influences on the manifestation of diabetes mellitus in Chinese hamsters. En *The Genetics of Diabetes Mellitus*. Springer Berlin Heidelberg, 1976. p. 165-187.
82. Rocca F, Plá J. Diabetes Experimentales. In: Rocca F, Plá J, editors. *Departamento de Publicaciones del SMU*; p. 69–75.
83. Stojanovska L, Rosella G, Proietto J. Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol* . 1990 May;258 (5 Pt 1):E748-56.
84. Foglia V, Rodriguez R, Schuster N. No TitleInfluence of sex in rat diabetes. *Proc AM Diabetes Assoc*. 1946;6:511–3.
85. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* . 2001 Jan;50 (6):537–46.
86. Bedoya FJ, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* . 1996 Apr 15;52 (4):344–7.
87. Bolaffi JL, Nagamatsu S, Harris J, Grodsky GM. Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation, of streptozotocin inhibition of insulin secretion. *Endocrinology* . 1987 May;120 (5):2117–22.
88. Pitkin RM, Reynolds WA. Diabetogenic effects of streptozotocin in rhesus monkeys. *Diabetes* . 1970 Feb;19 (2):85–90.

89. Brosky G, Logothetopoulos J. Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes* . 1969 Sep;18 (9):606–11.
90. Ezekwe MO, Ezekwe EI, Sen DK, Ogolla F. Effects of maternal streptozotocin-diabetes on fetal growth, energy reserves and body composition of newborn pigs. *J Anim Sci*. 1984 Oct;59 (4):974–80.
91. Hermansen K. Characterisation of the abnormal pancreatic D and A cell function in streptozotocin diabetic dogs: studies with D-glyceraldehyde, dihydroxyacetone, D-. *Diabetologia*. 1981 Nov;21 (5), 489-494.
92. Bailey C, Flatt P. Model for testing new hypoglycaemia drugs. In: Bailey C, Flatt P, editors. *New antidiabetic drugs*. London: Smith Gordon; 1990. p. 65–82.
93. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* . 1970 Dec;22 (4):485–518.
94. Evan AP, Mong SA, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC. The effect of alloxan, and alloxan-induced diabetes on the kidney. *Anat Rec* . 1984 Jan;208 (1):33–47.
95. Jain DK, Arya RK. Anomalies in alloxan-induced diabetic model: It is better to standardize it first. *Indian J Pharmacol* . 2011 Feb;43 (1):91.
96. Goodman I, Gilman A. The pharmacological basis of therapeutics. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. 2nd ed. New York: Macmillan Company; 1955. p. 1636–8.
97. Bunnag SC, Warner NE, Bunnag S. Effect of alloxan on the mouse pancreas during and after recovery from diabetes. *Diabetes* . 1967 Feb;16 (2):83–9.
98. Lazarow A. Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. *Diabetes*;1 (5):363–72.
99. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* . 2004 May 6;429 (6987):41–6.
100. Pincus IJ, Hurwitz JJ, Scott ME. Effect of rate of injection of alloxan on development of diabetes in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* . 1954 Jul;86 (3):553–4.
101. Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerström C, Andersson A. Major species differences between humans and rodents in the

- susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 1994 Sep 27;91 (20):9253–6.
102. de Lussanet QG, van Golde JCG, Beets-Tan RGH, Post MJ, Huijberts MS, Schaper NC, et al. Dynamic contrast-enhanced MRI of muscle perfusion combined with MR angiography of collateral artery growth in a femoral artery ligation model. *NMR Biomed* . 2007 Dec;20 (8):717–25.
  103. Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, et al. Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells* . 2008 Oct;26 (10):2625–33.
  104. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Murakami S, Matsumoto T, et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* . 2005 Jun 1;66 (3):543–51.
  105. Paek R, Chang DS, Brevetti LS, Rollins MD, Brady S, Ursell PC, et al. Correlation of a simple direct measurement of muscle pO<sub>2</sub> to a clinical ischemia index and histology in a rat model of chronic severe hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* . 2002 Jul;36 (1):172–9.
  106. Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Messina LM. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* . 2005 Feb;41 (2):312–20.
  107. Al-Khalidi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* . 2003 Jan;75 (1):204–9.
  108. Shibata T, Naruse K, Kamiya H, Kozakae M, Kondo M, Yasuda Y, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves diabetic polyneuropathy in rats. *Diabetes* . 2008 Nov;57 (11):3099–107.
  109. Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Concise review: Mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus. *Stem Cells* . 2011 Jan;29 (1):5–10.

110. Gu W, Hong X, Potter C, Qu A, Xu Q. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation* . 2017 Jan;24 (1):e12324.
111. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006 Apr 1;20 (6):661–9.
112. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* . 2000 Sep 14;407 (6801):249–57.
113. Norrby K. Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *APMIS* . 2006 Feb;114 (2):79–102.
114. Norrby K, Nordenhem A. Dalteparin, a low-molecular-weight heparin, promotes angiogenesis mediated by heparin-binding VEGF-A in vivo. *APMIS* . 2010 Dec;118 (12):949–57.
115. Horio T, Fujita M, Tanaka Y, Ishihara M, Kishimoto S, Nakamura S, et al. Efficacy of fragmin/protamine microparticles containing fibroblast growth factor-2 (F/P MPs/FGF-2) to induce collateral vessels in a rabbit model of hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* . 2011 Sep;54 (3):791–8.
116. Lan RF, Liu ZX, Liu XC, Song YE, Wang DW. CD151 promotes neovascularization and improves blood perfusion in a rat hind-limb ischemia model. *J Endovasc Ther* . 2005 Aug;12 (4):469–78.
117. Scott G, King JB. A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones. *J Bone Joint Surg Am*. 1994 Jun;76 (6):820–6.
118. Reihani Kermani H, Pourghazi M, Mahani SE. Effects of pulsed electromagnetic field on intervertebral disc cell apoptosis in rats. *Electromagn Biol Med* . 2013 Oct; 33 (3), 246-249.
119. Galace de Freitas D, Marcondes FB, Monteiro RL, Rosa SG, Maria de Moraes Barros Fucs P, Fukuda TY. Pulsed Electromagnetic Field and Exercises in Patients With Shoulder Impingement Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Arch Phys Med Rehabil* . 2014 Feb;95 (2):345-52.
120. Smith TL, Wong-Gibbons D, Maultsby J. Microcirculatory effects of pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res* . 2004 Jan;22 (1):80–4.

121. Nakae M, Kamiya H, Naruse K, Horio N, Ito Y, Mizubayashi R, et al. Effects of basic fibroblast growth factor on experimental diabetic neuropathy in rats. *Diabetes* . 2006 May;55 (5):1470–7.
122. Goudarzi I, Hajizadeh S, Salmani ME, Abrari K. Pulsed electromagnetic fields accelerate wound healing in the skin of diabetic rats. *Bioelectromagnetics* . 2010 May;31 (4):318–23.
123. Pan Y, Dong Y, Hou W, Ji Z, Zhi K, Yin Z, et al. Effects of PEMF on microcirculation and angiogenesis in a model of acute hindlimb ischemia in diabetic rats. *Bioelectromagnetics* . 2013 Apr;34 (3):180–8.
124. de Lussanet QG, Beets-Tan RGH, Backes WH, van der Schaft DWJ, van Engelshoven JMA, Mayo KH, et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging at 1.5 Tesla with gadopentetate dimeglumine to assess the angiostatic effects of anginex in mice. *Eur J Cancer* . 2004 May;40 (8):1262–8.
125. Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, Griffiths JR, Horsman MR, Jackson A, et al. Assessment of antiangiogenic and antivascular therapeutics using MRI: recommendations for appropriate methodology for clinical trials. *Br J Radiol* . 2003 Jan;76 Spec No:S87-91.
126. Padhani AR. Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical oncology: current status and future directions. *J Magn Reson Imaging* . 2002 Oct;16 (4):407–22.
127. Luo Y, Mohning KM, Hradil VP, Wessale JL, Segreti JA, Nuss ME, et al. Evaluation of tissue perfusion in a rat model of hind-limb muscle ischemia using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* . 2002 Sep;16 (3):277–83.
128. Brevetti LS, Chang DS, Tang GL, Sarkar R, Messina LM. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J Vasc Surg* . 2003 Oct;38 (4): 820–6.
129. Chang DS, Su H, Tang GL, Brevetti LS, Sarkar R, Wang R, et al. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of VEGF normalizes skeletal muscle oxygen tension and induces arteriogenesis in ischemic rat hindlimb. *Mol Ther* . 2003 Jan;7 (1):44–51.



130. Hopf HW, Viele M, Watson JJ, Feiner J, Weiskopf R, Hunt TK, et al. Subcutaneous perfusion and oxygen during acute severe isovolemic hemodilution in healthy volunteers. *Arch Surg* . 2000 Dec;135 (12):1443–9.
131. Shimp M, Ikeda U, Maeda Y, Takahashi M, Miyashita H, Mizukami H, et al. AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* . 2002 Mar;53 (4):993–1001.
132. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, et al. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* . 2001 Feb 13;103 (6):897–903.
133. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *N Engl J Med* . 2007 Jan 18;356 (3):213–5.
134. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* . 1993 Feb;16 (2):434–44.
135. White J V. General Considerations. In: Cronenwett JL, Johnston Wayne K, Cambria R, editors. *Rutherford's Vascular Surgery*. 7th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2010. p. 1576–92.
136. Bradbury AW, Adam DJ, Bell J, Forbes JF, Fowkes FGR, Gillespie I, et al. Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial: An intention-to-treat analysis of amputation-free and overall survival in patients randomized to a bypass surgery-first or a balloon angioplasty-first revascularization strategy. *J Vasc Surg* . 2010 May;51 (5):5S–17S.
137. Hiatt WR, Hiatt WR. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med* . 2001 May 24;344 (21):1608–21.
138. Simons M, Ware JA. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* . 2003 Nov;2 (11):863–71.
139. Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* . 2002 Jan 1;136 (1):54–71.

140. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* . 2015 Jun;26 (3):311–27.
141. Domouzoglou EM, Naka KK, Vlahos AP, Papafaklis MI, Michalis LK, Tsatsoulis A, et al. Fibroblast growth factors in cardiovascular disease: The emerging role of FGF21. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2015 Sep 15; 309 (6):H1029-38.
142. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost* . 2015 Dec;13 (12):2141–51.
143. Novakova V, Sandhu GS, Dragomir-Daescu D, Klabusay M. Apelinergic system in endothelial cells and its role in angiogenesis in myocardial ischemia. *Vascul Pharmacol* . 2016 Jan;76:1–10.
144. Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* . 2006 Jan;17 (5–6):279–90.
145. Salazar Álvarez AE, García Arranz M, Riera Del Moral L, Mendieta Azcona C, Leblic Ramírez I, Fernández Heredero Á. Adipose mesenchymal stromal cell therapy in a desperate case of right-hand ischemia. *Cytotherapy* . 2016 Jun;18 (6):725–8.
146. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* . 2002 Dec 1;13 (12):4279–95.
147. Kim S-W, Han H, Chae G-T, Lee S-H, Bo S, Yoon J-H, et al. Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells* . 2006 Jun;24 (6):1620–6.
148. Lu D, Zhang L, Wang H, Zhang Y, Liu J, Xu J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) enhances engraftment and angiogenesis of mesenchymal stem cells in diabetic hindlimb ischemia. *Diabetes* . 2012 May;61 (5):1153-9.
149. Hou C, Shen L, Huang Q, Mi J, Wu Y, Yang M, et al. The effect of heme oxygenase-1 complexed with collagen on MSC performance in the

- treatment of diabetic ischemic ulcer. *Biomaterials* . 2013 Jan;34 (1):112–20.
150. He S, Shen L, Wu Y, Li L, Chen W, Hou C, et al. Effect of brain-derived neurotrophic factor on mesenchymal stem cell-seeded electrospinning biomaterial for treating ischemic diabetic ulcers via milieu-dependent differentiation mechanism. *Tissue Eng Part A* . 2015 Mar;21 (5–6):928–38.
  151. Liu J, Hao H, Xia L, Ti D, Huang H, Dong L, et al. Hypoxia pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells facilitates angiogenesis by improving the function of endothelial cells in diabetic rats with lower ischemia. *PLoS One* . 2015;10 (5):e0126715.
  152. Tong C, Hao H, Xia L, Liu J, Ti D, Dong L, et al. Hypoxia pretreatment of bone marrow-derived mesenchymal stem cells seeded in a collagen-chitosan sponge scaffold promotes skin wound healing in diabetic rats with hindlimb ischemia. *Wound Repair Regen* . 2016 Jan;24 (1):45–56.
  153. Yan J, Tie G, Wang S, Messina KE, DiDato S, Guo S, et al. Type 2 diabetes restricts multipotency of mesenchymal stem cells and impairs their capacity to augment postischemic neovascularization in db/db mice. *J Am Heart Assoc* . 2012 Dec;1 (6):e002238.
  154. Kim H, Han JW, Lee JY, Choi YJ, Sohn Y-D, Song M, et al. Diabetic Mesenchymal Stem Cells Are Ineffective for Improving Limb Ischemia Due to Their Impaired Angiogenic Capability. *Cell Transplant* . 2015;24 (8):1571–84.
  155. Capla JM, Grogan RH, Callaghan MJ, Galiano RD, Tepper OM, Ceradini DJ, et al. Diabetes impairs endothelial progenitor cell-mediated blood vessel formation in response to hypoxia. *Plast Reconstr Surg* . 2007 Jan;119 (1):59–70.
  156. Loomans CJM, de Koning EJP, Staal FJT, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* . 2004 Jan ;53 (1):195–9.
  157. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit

- impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* . 2002 Nov 26;106 (22):2781–6.
158. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes*. 2007 Mar 1;56 (3):666–74.
  159. Wittekind D. Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain. *Biotech Histochem* . 2003 Oct;78 (5):261–70.
  160. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. NIH Public Access; 2013 Jun;15 (6):641–8.
  161. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* . 2004 May;27 (5):1047–53.
  162. Iwashima S, Ozaki T, Maruyama S, Saka Y, Kobori M, Omae K, et al. Novel culture system of mesenchymal stromal cells from human subcutaneous adipose tissue. *Stem Cells Dev* . 2009 May;18 (4):533–43.
  163. del Moral L R, Alvarez A S, Kiuri S S, H T, Cubas L R de, Olmo D G, et al. Phase Ib Open Clinical Trial to Assess the Safety of Autologous Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Nonrevascularizable Critical Lower Limb Ischemia. *J Stem Cell Res Ther. OMICS International*; 2017;7 (6).
  164. Zbinden S, Clavijo LC, Kantor B, Morsli H, Cortes GA, Andrews JA, et al. Interanimal variability in preexisting collaterals is a major factor determining outcome in experimental angiogenesis trials. *AJP Hear Circ Physiol*. 2006 Dec 1;292 (4):H1891–7.
  165. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*. 2008 Mar;Chapter 5:Unit 5.47.
  166. Arison RN, Feudale EL. Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. *Nature* . 1967 Jun 17;214 (5094):1254–5.

167. Hard GC. Identification of a high-frequency model for renal carcinoma by the induction of renal tumors in the mouse with a single dose of streptozotocin. *Cancer Res* . 1985 Feb;45 (2):703–8.
168. Zhao Y, Yi F-Z, Zhao Y-H, Chen Y-J, Ma H, Zhang M. The Distinct Effects of Estrogen and Hydrostatic Pressure on Mesenchymal Stem Cells Differentiation: Involvement of Estrogen Receptor Signaling. *Ann Biomed Eng* . 2016 Oct 2;44 (10):2971–83.
169. Feng C, Hu J, Liu C, Liu S, Liao G, Song L, et al. Association of 17-  $\beta$  Estradiol with Adipose-Derived Stem Cells: New Strategy to Produce Functional Myogenic Differentiated Cells with a Nano-Scaffold for Tissue Engineering. Papaccio G, editor. *PLoS One*. 2016 Oct 26;11 (10):e0164918.
170. Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol* . 2008 Jan 17;115 (2):163–72.
171. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol*. 2016 Jan 17;17 (1):34–40.